

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1969

THESE

N 852

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Olivier, Franklin, Noël LACHAND

Né le 12 Septembre 1943 à NEUILLY s/Seine

Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le

TENTATIVE D'UTILISATION DE LA TECHNIQUE
DES "ROSETTES" DANS LE DIAGNOSTIC
DE L'ALLERGIE MÉDICAMENTEUSE

Président : Monsieur P. MILLIEZ (Professeur)

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI*

1969

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

-:-

Année 1969

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Olivier, Franklin, Noël LACHAND

Né le 12 septembre 1943 à Neuilly s/Seine

Externe des Hôpitaux de Paris

-:-

Présentée et soutenue publiquement le

-:-

TENTATIVE D'UTILISATION DE LA TECHNIQUE

DES "ROSETTES" DANS LE DIAGNOSTIC DE

L'ALLERGIE MEDICAMENTEUSE

-:-

Président : Monsieur P. MILLIEZ (Professeur)

-:-

DACTYLO-SORBONNE

8, rue Casimir Delavigne

PARIS - 6ème

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549931_0024

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

--

Année 1969

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Olivier, Franklin, Noël LACHAND

Né le 12 septembre 1943 à Neuilly s/Seine

Externe des Hôpitaux de Paris

--

Présentée et soutenue publiquement le

--

TENTATIVE D'UTILISATION DE LA TECHNIQUE

DES "ROSETTES" DANS LE DIAGNOSTIC DE

L'ALLERGIE MEDICAMENTEUSE

--

Président : Monsieur P. MILLIEZ (Professeur)

--

DACTYLO-SORBONNE

8, rue Casimir Delavigne

PARIS - 6ème

1969



PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ALAJOUANINE (T), BENARD (H), BERNARD (E),
 BINET (L), BULLIARD (H), CATHALA (J), CHABROL (E),
 CHAILLEY-BERT (P), CHEYMOL (J), COSTE (F.),
 DEBRE (R), DECHAUME (M), GALLIARD (H), GAUDARD
 d'ALLAINES (F.de), GENNES (L.de), GIROUD (A),
 HAZARD (R), HEUYER (G), LACOMME (M), LAMY (M),
 LAROCHE (G), LELONG (M), LEVY (Mlle J), LEVY-
 SOLAL (E), LIAN (C), MADURO (R), MARCHAL (G),
 MATHIEU (P), MONOD (R), MOREAU (R), MOULONGUET (P),
 PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D),
 PIEDELIEVRE (R), QUENU (J), RENARD (G), SENEQUE (J),
 STROHL (A), TANON (L), TURPIN (R), VERNE (J).

DOYEN	Georges BROUET
1er assesseur	Daniel BARGETON
2e assesseur	Jean GOSSET

A - CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

		MM.
Anatomie	{	DELMAS (A)
.....	{	HUARD (P)
à titre personnel		CABROL (Ch)
- -		OLIVIER (G)
Anatomie et Cytologie patho-		DELARUE (J)
logiques à titre personnel		NEZELOF (Ch)
- -		ORCEL (L)
Biochimie médicale	{	JAYLE (M.F)
.....	{	DESGREZ (P)
.....	{	POLONOVSKI (J)
Chimie Pathologique		SCHAPIRA (G)
à titre personnel		CARTIER (P)
- -		DREYFUS (J.Cl)
Biologie médicale (à titre per-		BOURLIERE (F)
sonnel)		HARTMANN (L)
.....	{	BUGNARD (L)
Biophysique médicale	{	DJOURNO (A)
.....	{	DOGNON (A)

Biophysique médicale		
à titre personnel		KELLERSHOHN (L)
-	-	GOUGEROT (L)
-	-	ROUCAYROL (J.Cl)
Cancérologie expérimentale		MATHE (G)
Génétique fondamentale		LEJEUNE (J)
	{	COUJARD (R)
Histologie et Embryologie	{	TUCHMANN-
	{	DUPLESSIS (H)
à titre personnel		RACADOT (J)
Microbiologie		FASQUELLE (R)
Bactériologie et Virologie		TOURNIER (P)
à titre personnel		BARBIER (P)
Parasitologie		LARIVIERE (M)
Pathologie expérimentale et comparée		MERKLEN (F.P)
à titre personnel		LOEPER (J)
Pharmacologie	{	BOISSIER (J.R)
	{	LECHAT (P)
	{	BARGETON (D)
Physiologie	{	MALMEJAC (J)
	{	PARROT (J)
à titre personnel		DEJOURS (P)
Physiologie et biologie appliquée aux sports		SCHERRER (J)

B - CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

I°.- Médecine

Biologie médicale		FAUVERT (R)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie		COURY (Ch.)
Hygiène et Médecine préventive		BOYER (J)
Médecine du Travail		DESOILLE (H)
Médecine légale, droit médical et déontologie		DEROBERT (L)
Pathologie exotique		BRUMPT (L.C)
	{	BUGE (A)
	{	BRICAIRE (H)
Pathologie médicale	{	CORNET (A)
	{	HOUSSET (E)
	{	LAROCHE (Cl.)

Pathologie médicale

à titre personnel	AZERAD (E)
- -	BOUR (H)
- -	BROCARD (H)
- -	CAROLI (J)
- -	FACQUET (J)
- -	LAMBLING (A)
- -	LAUNAY (Cl.)
- -	PAYET (M)
- -	PERRAULT (M)
- -	SIGUIER (F)
- -	WORMS (R)
- -	BOUVIER (J)

Pathologie respiratoire TURIAF (J)

Pathologie et Thérapeutique

générales	MAURICE (P)
Thérapeutique	LAMOTTE (M)
Thérapeutique appliquée	MARCHE (J)

Chaires de Cliniques :

Clinique cardiologique (Boucicaut)	LENEGRE (J)
- - (Broussais)	SOULIE (P)
Clinique dermatologique (St-Louis)	DUPERRAT (F)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J)
Clinique des maladies infectieu- ses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P)
à titre personnel	BASTIN (R)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J)
à titre personnel (neuro- psychiatrie)	PICHOT (P)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R)
à titre personnel	LHERMITTE (F)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L)

Clinique des maladies du sang		
(Broussais)	BERNARD (J)	
à titre personnel (hématologie)	ANDRE (R)	
-	BOUSSER (J)	
-	DREYFUS (B)	
Cliniques médi- cales	Bicêtre	DEPARIS (M)
	Broussais	MILLIEZ (P)
	Cochin	PEQUIGNOT (H)
	Hôtel-Dieu	BARIETY (M)
	Pitié	DREYFUS (G)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G)
	-	CONTE (M)
	-	KOURILSKY (R)
Clinique médicale propédeutique	JUSTIN-	
(Broussais)	BESANCON (L)	
Clinique thérapeutique médicale		
(Saint-Antoine)	LEMAIRE (A)	
Clinique et Séméiologie médicales		
(Antoine-Chantin)	DOMART (A)	
Séméiologie médicale (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y)	
- (Pitié)	RAMBERT (P)	
- (Rothschild)	WOLFROMM (R)	
Clinique d'Hydrologie et de Cli- matologie (Bichat)	DEBRAY (Ch)	
à titre personnel	GIBERTON (A)	
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques		
(Hôtel-Dieu)	DEROT (M)	
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J)	
à titre personnel	RICHET (G)	
-	CROSNIER (J)	
Clinique de Génétique médicale		
(Enfants-Malades)	ROYER (P)	
Clinique des maladies des enfants		
(Enfants-Malades)	MOZZICONACCI (P)	
Clinique médicale infantile et de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J)	
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	BRISAUD (H)	
à titre personnel	LESOBRE (R)	
Clinique de pédiatrie et de pué- riculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S)	

MM.

Hygiène et Clinique de la première	
enfance (Trousseau)	LAPLANE (R)
à titre personnel	POLONOVSKI (Cl.)
Clinique de pneumo-ptisiologie	
(Laennec)	BROUET (G)
à titre personnel	KREIS (B)
- -	MEYER (A)

Clinique de rééducation motrice	GROSSIORD (A)
---------------------------------	---------------

Electroradiologie	{ LEDOUX-
	{ LEBARD (M)
	{ LEFEBVRE (J)

Radiologie médicale	DESGREZ (H)
à titre personnel	FISCHGOLD (H)
- -	TUBLANA (M)
- -	CHERIGIE (E)

Clinique de rhumatologie médicale	
et sociale (Cochin)	DELBARRE (F)

Clinique rhumatologique	
(Lariboisière)	SEZE (S.de)

Clin. toxicologique (Fernand-Widal)	GAULTIER (M)
2°- <u>Chirurgie</u>	

Anesthésiologie	VOURC'H (G)
	{ LAURENCE (G)
Pathologie chirurgicale	{ KUSS (R)
	{ N...
à titre personnel	RAMADIER (J)

Physiologie et pathologie obsté-	
tricales	MORIN (P)

Technique chirurgicale et chirur-	
gie expérimentale	MONSAINGEON (A)

Chaires de Cliniques :

Clinique carcinologique	
(Gustave-Roussy)	DENOIX (P)

Clinique carcinologique chirurgi-	
cale (Necker)	REDON (H)
à titre personnel	BREHANT (J)

MM.

Cliniques chirurgicales	{ Beaujon	LORTAT-JACOB (J.L)
	{ -	BAUMANN (J)
	{ Cochin	LEGER (L)
	{ Hôtel-Dieu.....	PATEL (J)
	{ St-Antoine.....	GOSSET (J)
	{ Salpêtrière.....	SICARD (A)
	{ Tenon	OLIVIER (Cl.)

Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M)
Séméiologie et clinique chirurgicales(Broussais)	POILLEUX (F.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Saint-Louis).....	DEBEYRE (J)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique(Cochin)	MERLE d'AUBIGNE(R)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Foch)....	PADOVANI (P)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Beaujon)	CAUCHOIX (J)
Clinique traumatologique et orthopédique (Raymond-Poincaré)...	JUDET (R)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique(Enfants-Malades)	FEVRE (M)
à titre personnel	CHIGOT (P.L)
Clinique de chirurgie cardiovasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)	MATHEY(J)
à titre personnel	GAUDART D'ALLAINES (Cl. de)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)	HUGUIER (J)
Clinique obstétricale (Baudelocque)	LEPAGE (F)
Clinique obstétricale (Saint-Antoine)	MERGER (R)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M)
à titre personnel	LEBEAU (J.)

	MM.
Clinique ophtalmologique(Cochin)...	BREGEAT (P)
- (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	CERNEA (P)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P)
- (Necker)	COUVELAIRE (R)

C - PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie	GILLOT (Cl.)
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D)
Bactériologie	LE MINOR (L)
	{ CARTIER (P)
Biochimie médicale	{ GONNARD (P)
	{ NORMANN (J)
Chirurgie	CERBONNET (G)
	{ BESSIS (M)
Hématologie	{ BILSKI-PASQUIER (G)
	{ BLANCHER (G)
Hygiène	{ CORRE-HURST (Me L)
	{ CECCAL (P)
Médecine légale	{ HADENGUE (A)
	{ FOURNIER (E)
Médecine générale	AUSSENNAIRE (M)
Maladies infectieuses	DUPONT (V)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G)
Pédiatrie	ROSSIER (A)
	{ COURSAGET (J)
Physique médicale	{ GREMY (F)
	{ PELLERIN (P)
	{ DURAND (J)
Physiologie	{ GIRARD (Fr.)
	{ HUGELIN (A)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A)
Pharmacologie	SCHMITT (H)

D - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVER- SITES ETRANGERES

Pathologie chirurgicale	RUDLER (J)
	Pr.s.ch.

E - PROFESSEURS ASSOCIES

	MM.
Hormonologie	MORICARD (R)
Statistique médicale et	
épidémiologie	SCHWARTZ (D)
Néphrologie	MAXWELL (M)
Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J)
Conseiller administratif	M. SALLIER (G)
Conservateur en Chef de la Bi-	{
bliothèque	
Conservateur du Musée d'Histoire	
de la Médecine	M.le Docteur HAHN (A)
Conservateurs	{
	Mme FORGET (F)
	Mlles DUMITRE (P),
	{ LAURENT(H), LE NOIR(G)
	{
	Mmes CONTET (J)
	{ Mlles DUROZOY(M.F)
Bibliothécaires	{ ROBERGE (D),
	{ LE QUANG LINH (G),
	{ REUGE (M)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur P. MILLIEZ

Professeur de clinique médicale à la
Faculté de Médecine de Paris

Doyen du secteur hospitalo-universitaire
Broussais-Hôtel-Dieu

Médecin des Hôpitaux de Paris

Qui nous a fait l'honneur
d'accepter la présidence
de cette thèse

A Monsieur le Professeur B.N. HALPERN

Professeur au Collège de France

Directeur de l'Institut d'immuno-biologie

Qui nous a fait l'honneur de
nous ouvrir son laboratoire

Et qui a bien voulu nous diriger
dans ce travail avec sa
compétence inestimable et son
aimable courtoisie

A Monsieur le Professeur J. HAZARD

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine
de Paris

Médecin des hôpitaux de Paris

Qui nous a ouvert avec bienveil-
lance son service

Qui nous a fait bénéficier de ses
connaissances cliniques et
allergologiques

Et qui nous a conseillé pour la
rédaction de cette thèse

A Monsieur le Docteur N.T. KY

Attaché de la consultation d'allergologie
de l'Hôpital Broussais

Qui nous a inspiré le sujet de
cette thèse

Et qui nous a aidé par son
esprit lucide et ses conseils
éclairés à bien orienter ce
travail

Au Docteur Nouhal AMACHE

Médecin résident Etranger

Qui nous a aidé d'un bout à
l'autre de ce travail par sa
haute compétence technique

Et qui a bien voulu collaborer
avec nous d'une façon très
amicale

TENTATIVE D'UTILISATION DE LA
TECHNIQUE DES "ROSETTES" DANS LE DIAGNOSTIC
DE L' ALLERGIE MEDICAMENTEUSE

INTRODUCTION

-3-

La justification de ce travail se trouve dans la place qu'occupe l'allergie médicamenteuse de nos jours, et dans les difficultés pratiques que l'on rencontre pour en poser le diagnostic.

Dans un premier chapitre, nous nous proposons de situer l'allergie médicamenteuse parmi l'ensemble des accidents imputables aux médicaments, et de passer une revue critique des différents tests "in vivo" et "in vitro" qui peuvent aider au diagnostic, afin de conclure sur l'intérêt théorique que présente le test de la "rosette", test "in vitro" commodément et rapidement applicable au diagnostic de l'hypersensibilité médicamenteuse.

Dans un deuxième chapitre, nous ferons un bref rappel des travaux qui sont, en partie du moins, à l'origine de ce test, avant d'exposer succinctement les résultats obtenus par les auteurs qui l'ont créé et expérimenté les premiers.

Puis nous exposerons dans le troisième chapitre tout le détail du matériel et de la méthode initialement employés, tandis que le quatrième chapitre sera consacré aux difficultés techniques rencontrées pour la mise au point de ce

test, et à l'exposé justifié des diverses modifications apportées à la méthode initialement décrite.

Nous grouperons alors dans le cinquième chapitre l'étude détaillée du test appliqué à une trentaine de cas, dont une majeure partie d'allergies à la pénicilline, cet antigène étant choisi pour son intérêt pratique : fréquence et gravité de la sensibilisation, nécessité d'en faire parfois le diagnostic très rapidement - dans l'endocardite d'Osler par exemple -, et nombre important de malades disponibles, explorés à la consultation d'allergologie de l'hôpital Broussais. Les résultats seront étudiés dans la plupart des cas en utilisant le test de transformation lymphoblastique (cf. ci-après) comme référence.

Enfin, nous essaierons dans le sixième et dernier chapitre, de discuter ce test et d'en faire la critique, avant de conclure.

CHAPITRE I

RAPPEL DE QUELQUES GENERALITES

La consommation sans cesse croissante de médicaments chaque jour plus nombreux et variés, entraîne dans son sillage une pathologie iatrogène de plus en plus importante et de mieux en mieux connue, grâce aux multiples études suscitées par l'incidence pratique considérable que ces accidents représentent en médecine.

Parmi tous les incidents et accidents imputables aux médicaments, il est bien certain que malgré la vogue actuelle pour tout ce qui concerne l'allergie, une grande partie ne doit pas être confondue avec un mécanisme d'hypersensibilité. Il en est ainsi des accidents reposant sur des causes aussi diverses que la toxicité, l'intolérance, la réactivation, l'idiosyncrasie et l'histamino-libération : cette dernière cause étant particulièrement importante puisqu'il est bien établi que divers médicaments possèdent la propriété d'induire la libération d'histamine, en dehors de tout conflit antigène-anticorps, par action directe sur la réaction enzymatique contrôlant les liaisons inactivantes de l'histamine circulante aux protéines sériques (1 et 2).

Néanmoins, l'hypersensibilité représente de loin, aux côtés de la toxicité, la part la plus

importante de cette riche pathologie iatrogène ; et quand bien même elle serait moins fréquente que les accidents par toxicité, ceux-ci posent en fait moins de problèmes dans la mesure où l'expérimentation qui précède la commercialisation d'un nouveau produit vient en révéler assez régulièrement les aspects, tandis que celle-là est par nature le plus souvent imprévisible, tant en ce qui concerne l'éventualité de sa survenue que la nature des réactions qu'elle peut revêtir. Tous ces éléments donnent indiscutablement à l'allergie médicamenteuse une place importante au sein de l'ensemble de la pathologie allergique, et expliquent l'intérêt que tous les médecins lui portent, et les efforts qui sont déployés dans le monde entier pour son étude. Mais l'élément essentiel reste son diagnostic pratique, et nous allons voir que jusqu'à une date récente, il était impossible de le poser avec certitude dans près de la moitié des cas.

Le premier temps nécessaire pour porter le diagnostic d'hypersensibilité à un médicament, repose comme toujours sur la clinique, ce qui suppose une connaissance parfaite des types et des aspects que peuvent prendre ces réactions d'hypersensibilité. Malgré cela, il est aisé de constater que le sujet est vaste, et que le polymorphisme de ces accidents, ainsi que les causes très diverses qui peuvent être à l'origine de bon nombre d'entre eux, empêche bien souvent d'arriver au diagnostic par la seule clinique. Aussi depuis longtemps des efforts sont faits pour s'aider de tests destinés à faciliter ce diagnostic, à tel point que très souvent pour le "public", le seul mot "allergie" est immédiatement associé à la pratique de tests cutanés sur les bras, dont le côté spectaculaire

est certainement responsable mais qui, pour utiles qu'ils soient, sont malheureusement bien loin de résoudre tous les problèmes. Or, nous allons voir à la suite d'une rapide revue des tests actuellement utilisés, que seul un test "in vitro" d'introduction récente, le test de transformation lymphoblastique, possède entre autres la principale qualité qui fait le plus souvent défaut aux autres tests : la fidélité, grâce à quoi il est désormais possible de poser avec certitude un diagnostic d'allergie médicamenteuse.

Nous distinguerons deux catégories de tests : les tests "in vivo" et les tests "in vitro", et nous pouvons dire d'emblée que les seconds nous paraissent plus intéressants que les premiers pour les deux raisons suivantes :

- 1 - Etant réalisés par définition "en dehors" du malade, ils suppriment toute une série d'impondérables liés à la personnalité physique et psychique de ce malade.
- 2 - Ils sont dépourvus des dangers de bon nombre de tests "in vivo" basés sur la réintroduction dans l'organisme de l'antigène suspecté, avec les accidents graves qui peuvent en résulter dont nous avons déjà parlé.

I - TESTS PRATIQUES "IN VIVO" (3 et 4)

1/ Cuti-réaction (5).

La technique de la cuti-réaction doit être assez bien connue de tous : on dépose sur la scarification épidermique l'antigène, soit

liquide, soit en poudre, - auquel cas on doit le solubiliser en le diluant par exemple dans une goutte de soude en solution décimormale s'il est de nature protéique - et la lecture se pratique au mieux entre environ quinze et trente minutes après. L'apparition de la triade de Lewis : prurit et érythème, centrés par une papule ortiée, traduisant une réaction positive.

Ce test présente deux inconvénients : d'une part, en raison de la faible pénétration tissulaire, il n'est applicable qu'à la recherche d'une allergie de type humorale, et d'autre part, du fait que la plupart des médicaments sont des antigènes incomplets ou haptènes, la petite sérosité provoquée par la scarification ne semble pas dans bien des cas être capable de leur fournir leur complément protéique indispensable, et seuls les antigènes complets pourraient entraîner une réponse positive.

2/ Intradermo-réaction.

La technique de l'intradermo-réaction est également censée connue. L'antigène doit bien entendu être en solution, et la lecture se fait selon les mêmes critères que pour la cuti-réaction. La pénétration étant en principe supérieure à ce qu'elle était dans la cuti-réaction, cette technique peut être appliquée au diagnostic d'une allergie de type cellulaire, la positivité se traduisant par une papule inflammatoire apparaissant dans les quarante-huit heures environ, mais qu'il vaut mieux n'interpréter qu'après soixante douze heures seulement. Dans l'ensemble, les résultats ne sont guère favorables, en ce qui concerne l'allergie médicamenteuse tout au moins, et surtout, les risques de pénétration sanguine importante et par

suite de choc anaphylactique augmentent, ce qui fait que l'on évite d'y recourir dans toute la mesure du possible pour les allergènes les plus dangereux au moins.

3/ Réaction de Prausnitz-Küstner.

La réaction de Prausnitz-Küstner fait appel à un mécanisme de transfert passif des anticorps, d'un sujet donneur sensibilisé à un sujet receveur non sensibilisé, ce qui a pour avantage d'écarter tout risque de choc. La technique est simple : le sérum du donneur, supposé contenir les réagines, est injecté par voie sous-cutanée chez le receveur. On injecte ensuite l'antigène au même endroit mais vingt-quatre heures après, et les anticorps qui s'étaient momentanément fixés à l'endroit de l'injection, forment avec l'antigène un complexe histamino-libérateur ; il s'agit donc finalement d'une intra-dermo-réaction, et la lecture se fait sur les mêmes critères au bout de trente minutes environ. S'il est intéressant d'un point de vue théorique de savoir qu'un transfert passif a été réalisé dans une allergie cellulaire médicamenteuse de type retardée, par injection chez le receveur non plus de sérum mais de leucocytes du sujet sensibilisé, ceci reste sans portée pratique, et ce test s'applique exclusivement à l'allergie humorale, avec la même infidélité que l'intra-dermo-réaction.

4/ Le test de la fenêtre cutanée (6 à 8).

Ce test repose sur la technique suivante : on enlève au bistouri une petite pastille cutanée prenant le derme de un demi centimètre de diamètre, on applique alors l'antigène et on

recouvrir d'une lamelle plastique transparente. Ce test doit être pratiqué chez un malade hospitalisé, car la lamelle plastique est changée toutes les six heures pendant quarante-huit heures. Les huit pastilles ainsi utilisées sont alors observées successivement au microscope après coloration, et le test est considéré comme positif lorsqu'on trouve une forte proportion de basophiles et d'éosinophiles dans l'exsudat cellulaire recueilli. Malheureusement, il se trouve que ces deux types de cellules sont dépourvus de spécificité immunologique, n'étant liés qu'au simple phénomène de libération et de réabsorption de l'histamine, ce qui fait qu'au total, ce test de réalisation délicate et désagréable pour le patient est assez peu fidèle, et se montre en outre dangereux avec les médicaments anaphylactogènes.

5/ Epidermo-réaction (9).

L'épidermo-réaction se pratique en déposant l'antigène suspecté sur une zone cutanée préalablement dégraissée à l'éther ; on recouvre ensuite d'un pansement adhésif occlusif, et la lecture se fait au bout de quarante-huit heures environ. Le test est positif lorsque l'on constate une réaction reproduisant en miniature une dermite de contact, c'est-à-dire oedème, érythème, prurit et papulo-vésicules. Les résultats obtenus sont très satisfaisants lorsqu'on limite son champ d'application aux seules dermites de contact, ce test reproduisant alors ce qui se passe dans la réalité.

Au total : on peut dire que l'ensemble des tests "in vivo" présente un intérêt certain lorsqu'on sait les appliquer au mieux aux types

d'allergie dans lesquels ils offrent les meilleurs résultats. Ils ont en outre le grand intérêt - mais aussi parfois le danger - de déclencher une réaction focale ou générale qui représente un excellent critère de positivité. Malheureusement, ces tests présentent l'inconvénient d'offrir de fausses réponses positives chaque fois que l'on emploie un antigène histamino-libérateur, et surtout de fausses réponses négatives chaque fois que l'antigène est :

- soit un haptène, - ce qui est particulièrement fréquent dans l'allergie médicamenteuse - et que cet haptène ne se lie pas à son complément protéique, ce qui est indispensable pour le rendre antigénique ;
- soit un antigène monovalent, auquel cas cet antigène est simplement fixé sur les anticorps éventuellement présents, sans formation d'un réseau, et par suite sans pouvoir de stimulation sur les mastocytes histamino-libérateurs ;

et aussi mais plus rarement, chaque fois que l'antigène ne rencontre que des anticorps monovalents appelés anticorps bloquants, ce terme venant du fait que comme dans le cas précédent ils empêchent la formation du réseau nécessaire à la stimulation des mastocytes.

II - TESTS PRATIQUES "IN VITRO" (10).

Les qualités qui nous paraissent essentielles pour ces tests "in vitro" sont : la fidélité, la facilité de réalisation pratique, la netteté des critères de lecture, la rapidité de la réponse et la possibilité d'interprétation par

toute personne à tous moments. Nous allons donc voir si les tests actuellement utilisables répondent à ces données.

1/ L'hémagglutination passive (11 à 25).

L'hémagglutination passive a pour but de mettre en évidence la formation du complexe antigène-anticorps sous forme d'une agglutination de globules rouges de lapin revêtus de l'antigène, lorsqu'on les met en présence des anticorps correspondants présents dans le sérum du malade. Ce test, très intéressant dans son principe, est malheureusement de réalisation pratique très délicate, du fait de la difficulté qu'il y a à lier l'antigène aux globules rouges du lapin, et sa fidélité est fortement compromise par le fait actuellement bien établi qu'il met en jeu non pas des réagines, mais un autre type d'anticorps non sensibilisants. Ainsi dans l'allergie à la pénicilline, ce test est faussement négatif dans 30 % des cas où ce type d'anticorps manque, alors qu'il est faussement positif dans 16 % des cas chez des sujets non allergiques mais ayant déjà reçu sans incident de la pénicilline.

2/ Le test de Shelley (26 à 30).

Le test de Shelley repose sur l'observation "in vitro" de la dégranulation des leucocytes basophiles du lapin, mis en présence du complexe antigène suspecté + anticorps supposés présents dans le sérum du sujet sensibilisé, la dégranulation étant le témoin de la libération de l'histamine qui y est stockée. Or, nous avons déjà dit combien ce fait est peu spécifique. En outre, la lecture des lames est très

difficile car les basophiles du lapin se dégradent sous l'effet d'agressions minimales non spécifiques, ce qui fait que toujours dans l'allergie à la pénicilline par exemple, ce test est défaillant chez presque 50 % des sujets sensibilisés.

3/ Le test de transformation lymphoblastique (31 à 39).

Le test de transformation lymphoblastique, introduit par B.N. HALPERN et collaborateurs (et désigné sous le sigle TTL que nous emploierons désormais) est basé sur la différenciation du petit lymphocyte en une grande cellule blastique, le lymphoblaste, lorsque le lymphocyte déterminé se trouve en présence de l'antigène correspondant. On trouve à son origine les observations isolées de transformation non spécifique de Maximov, d'Osgood et de Nowell, et les premiers essais de transformation spécifique sont dus à Pearmain, à Elves, à Hirschorn, puis à Holland et Mauer. Mais on doit à B.N. Halpern, à N.T. Ky et à N. Amache d'avoir codifié cette technique, et de l'avoir appliquée à des domaines aussi divers que : l'allergie microbienne, parasitaire et mycosique, les allergies alimentaires, les affections auto-immunes, le degré d'histo-compatibilité, la mesure de la réactivité lymphocytaire à la phytohémagglutinine, et enfin et surtout l'allergie médicamenteuse, l'ensemble des problèmes concernant ce domaine ayant fait l'objet d'un travail récent de C. Pinon (39).

En pratique, les lymphocytes extraits du sang du sujet à explorer, sont mis en culture pendant quatre jours en présence de l'antigène suspecté. On procède alors à un étalement sur

lame, suivi de fixation, et la lecture se fait au microscope où il est possible de distinguer lymphocytes et lymphoblastes sur leur différence de taille et de couleur, de les compter, et d'établir le pourcentage de lymphoblastes par rapport aux lymphocytes. Ce test se rapproche fortement du test idéal par la très grande fidélité de sa réponse, - si on prend toutefois la précaution d'éliminer les sujets en cours de traitement par les corticostéroïdes, les immunodépresseurs, les antipaludiques de synthèse et probablement, mais à un degré moindre, tous les anti-inflammatoires généraux - par la netteté des critères de lecture, et par son interprétation facile à tous moments, les lames fixées et séchées pouvant se conserver indéfiniment. A l'opposé, il s'en écarte un peu quant à la facilité de réalisation pratique, et au délai de la réponse. Sur ce dernier point en effet, nous avons vu que la culture durait quatre jours, auxquels il convient d'ajouter une journée de manipulations initiales pour la mise en culture, et une journée de manipulations finales pour la préparation des lames et leur lecture, ce qui fait que la réponse ne peut pas être fournie avant le sixième jour. Or, il est parfois demandé aux allergologistes une réponse rapide, par exemple lorsqu'une endocardite d'Osler est diagnostiquée chez un malade suspecté d'être allergique à la pénicilline, ou lorsqu'une exploration radiologique à l'aide d'un produit iodé de contraste doit être exécutée d'urgence chez un malade suspecté d'être sensibilisé à ces produits. Il serait donc intéressant dans ces cas de pouvoir disposer d'un test aussi fidèle que le TTL, mais qui fournisse une réponse rapide, c'est-à-dire dans un délai maximal de vingt-quatre heures. Quant à la facilité de réalisation technique, il faut

bien reconnaître que le TTL nécessite une manipulation extrêmement délicate, ou plus exactement minutieuse du fait même qu'il s'agit d'une culture, et que la moindre contamination risque de tuer la préparation, et par conséquent de la rendre inutilisable. Ces difficultés techniques, sans enlever au TTL son énorme valeur intrinsèque, en font cependant un test "coûteux" qu'il sera difficile de faire entrer dans la pratique courante.

Existe-t-il alors un autre test qui réunisse les qualités du TTL sans présenter ces deux inconvénients ? C'est précisément à cette question que nous essaierons de répondre dans ce travail, en étudiant un test "in vitro" créé et expérimenté par S. Cruchaud et P.C. Frei, test qui semble a priori prometteur car de réalisation simple et à réponse rapide : le test de la "rosette".

CHAPITRE II

ORIGINES DE CE TEST

Le test de la rosette a pour origine essentielle les travaux parallèles et indépendants de Zaalberg d'une part (40), d'Osipova et Karasik d'autre part (11), et surtout de Nota, Liacopoulos-Briot, Stiffel, Biozzi et collaborateurs (42 à 45), travaux concernant le phénomène de l'immuno-cytho-adhérence, - que nous désignerons par la suite sous le sigle ICA - terme créé par ces derniers auteurs, et où apparaît pour la première fois ce terme de "rosette".

I/ L'ICA et les rosettes.

Des animaux sont immunisés par des injections de globules rouges hétérologues, puis sacrifiés, et l'on prélève des cellules lymphoïdes de diverses origines que l'on met en présence des globules rouges précédemment utilisés pour l'immunisation, ceux-ci jouant alors le rôle d'antigènes figurés. On constate dans ce cas que ces globules rouges viennent se fixer à la surface de certaines cellules, réalisant dans l'espace une figure en mûre, et dans un

plan une figure en "rosette". C'est ce phénomène que les auteurs ont appelé "immuno-cyto-adhérence".

L'ICA s'explique par la présence à la surface des cellules lymphoïdes étudiées, d'anticorps anti-globules rouges, et sert ainsi à détecter quelles sont les variétés de cellules porteuses d'anticorps. De plus, par le jeu d'une double immunisation, il est possible de distinguer les cellules sur lesquelles se sont fixés passivement ces anticorps anti-globules rouges, de celles qui sont productrices de ces mêmes anticorps. Au total, ces travaux ont permis d'une part de confirmer des publications antérieures et contemporaines d'autres auteurs qui faisaient déjà du tissu lymphoïde en général et des lymphocytes circulants en particulier le lieu de synthèse des anticorps (46 à 50), et offrent d'autre part un outil de travail éventuellement applicable, moyennant quelques adaptations, à la recherche et à la mise en évidence d'anticorps spécifiques, ce qui est d'un grand intérêt dans tous les phénomènes allergiques, et ouvre une nouvelle voie d'approche pour le diagnostic de l'hypersensibilité, médicamenteuse en particulier.

2/ Le test de la rosette.

Il dérive de la technique employée pour le phénomène de l'ICA, à laquelle on apporte deux modifications importantes :

- 1 - Les cellules lymphoïdes d'animaux sont remplacées par les lymphocytes du sang d'un malade supposé allergique, et
- 2 - les globules rouges hétérologues ne consti-

tuent plus l'antigène, mais un simple support à l'antigène supposé responsable de l'immunisation du malade.

Si le malade étudié est bien sensibilisé à l'antigène utilisé, ses lymphocytes sont normalement le support des anticorps correspondants, et ce système antigène + anticorps correspondants va aboutir, selon le phénomène de l'ICA, à la formation de rosettes, celles-ci étant formées par les globules rouges hétérologues revêtus de l'antigène, qui viennent se coller à la surface des lymphocytes.

Tel est le principe de ce test, mis au point, décrit et expérimenté par S. Cruchaud et P.C. Frei (51).

3/ Le test de l'hémagglutination.

Après avoir envisagé l'origine essentielle du test de la rosette, il nous semble devoir mentionner l'hémagglutination comme origine annexe dans la mesure où un problème technique dont nous verrons plus loin l'importance y est abordé : nous voulons parler de l'attelage de l'antigène aux globules rouges. Cette liaison est en effet un point qui nous semble d'emblée délicat, et les diverses méthodes qui ont été décrites dans les nombreuses publications consacrées à l'hémagglutination laissent supposer - comme l'essai de trop nombreux médicaments sur une maladie laisse supposer qu'aucun d'eux n'est réellement efficace - qu'aucune d'entre elles n'est entièrement satisfaisante. Parmi toutes ces méthodes, trois voies principales se détachent concernant le milieu propice à cette liaison :

1 - Fixation en milieu alcalin (11 à 15)

- 2 - Fixation en milieu neutre (16 à 21)
- 3 - Fixation à l'aide de la benzidine (22 à 25).

Mais Cruchaud et Frei ont eu recours pour leur part à une technique plus simple et plus anciennement décrite par A.B. Stavitsky (52), à propos déjà de l'hémagglutination, utilisant l'acide tannique et une fixation en milieu à pH acide.

4/ Résultats de Cruchaud et Frei (51).

Ces auteurs ont appliqué leur test à 23 cas d'allergie à la tuberculine : chez 11 malades présentant des manifestations cliniques évolutives de tuberculose, le test a été trouvé positif dans 5 cas, tandis que chez 12 malades ne présentant que des tests cutanés positifs, le test fut trouvé positif dans 4 cas, le critère de positivité étant arbitrairement fixé à 3 rosettes comptées pour 1.000 lymphocytes, entre la préparation et une préparation témoin utilisant des globules rouges non sensibilisés. Enfin, le test s'est bien montré négatif, sans formation d'aucune rosette, chez 4 patients témoins ayant des tests cutanés négatifs.

Ils ont ensuite appliqué leur test à 12 cas d'allergie médicamenteuse dont le diagnostic reposait sur des manifestations cliniques très évocatrices, et ont obtenu 10 tests positifs.

Puis ils ont ensuite appliqué leur test chez 6 malades présentant des manifestations cliniques d'allergie médicamenteuse, et chez qui pouvaient être soupçonnés entre 2 et 4 médicaments différents. Dans 4 cas, le test s'est montré

nettement positif avec un seul médicament, tandis que dans les deux autres cas le test était positif à 2 ou 3 médicaments, c'est-à-dire négatif quant au résultat diagnostic escompté.

Enfin, ils ont vérifié à 2 ou 3 reprises à huit jours d'intervalle, le devenir de tests initialement positifs chez 6 malades, et constaté ainsi la parfaite reproductibilité de leurs résultats dans les 6 cas.

Devant des résultats aussi favorables, nous avons cependant noté deux éléments qui nous semblent devoir être retenus :

- le premier élément est la différence obtenue entre la pénicilline G et le pénicilloyl-polylysine, lorsque ces deux antigènes sont utilisés comparativement chez un malade allergique à la pénicilline. Dans 2 cas où le test est positif avec la pénicilline G, le test est négatif avec le pénicilloyl-polylysine, tandis que dans deux autres cas où le test est une fois positif et une fois négatif en accord pour ces deux antigènes, on note cependant un pourcentage de rosettes nettement supérieur avec la pénicilline G. Or, il semble bien d'après de récents travaux (53 à 55) que l'acide pénicillénoïque soit l'antigène vrai dans l'hypersensibilité à la pénicilline, le pénicilloyl-polylysine employé en étant un dérivé stable, obtenu par l'union d'un radical pénicilloyl avec la polylysine, et dont la structure antigénique serait assez proche de celle des allergènes formés "in vivo" ;
- le deuxième élément est la discordance qui nous paraît exister entre un test nettement

positif à l'ampicilline, et un test absolument négatif à la méthicilline chez le même malade, alors que ces deux pénicillines de synthèse présentent normalement une sensibilité croisée.

Mais au total, ce test paraît cependant très prometteur, et c'est pourquoi nous avons décidé de l'expérimenter initialement sur quelques cas d'allergie à la pénicilline, dont la certitude nous était fournie grâce à un TTL positif.

CHAPITRE III

TECHNIQUE

Nous avons employé, au début tout au moins, une technique pratiquement semblable à celle décrite par Cruchaud et Frei, à l'exception toutefois d'un certain nombre de menus détails, et du mode d'isolement des lymphocytes, pour lequel nous avons utilisé une technique de filtration sur laine de verre (56) utilisée avec satisfaction pour le TTL.

I - Préparation des lymphocytes.

La réalisation de ce test demandant environ six heures, nous convoquons les malades le matin à jeun, ce qui permet d'obtenir les résultats en fin d'après-midi.

1/ Prélèvement du sang sur héparinate de calcium (+).

Après nettoyage de la peau à l'alcool, on pratique à l'aide d'une aiguille à plateau stérile une ponction veineuse dans une veine du pli du coude, et l'on recueille le sang dans un

flacon stérile de 120 ml dans lequel on a introduit auparavant environ 100 unités d'héparinate de calcium par ml de sang que l'on compte y recueillir, la quantité de sang nécessaire étant fonction du nombre de préparations que l'on compte réaliser, soit que l'on désire tester plusieurs antigènes, soit que l'on désire à titre d'essai technique, essayer plusieurs doses du même antigène. Le flacon est alors bouché hermétiquement puis agité, immédiatement après la fin de la ponction.

(*) Calciparine : Laboratoires Choay.

2/ Filtration sur laine de verre (±)

Le sang est introduit dans une colonne de verre de 2 cm de diamètre pour 20 cm de hauteur, fermée à sa base par un diaphragme de verre percé de trous calibrés, et où l'on a introduit et tassé 5 g de laine de verre pour 60 ml de sang à filtrer. L'extrémité supérieure du tube est fermée par un bouchon traversé par un petit tube en verre qui laisse passer l'air au travers d'un coton, à mesure que la filtration s'effectue, tandis que l'extrémité inférieure du tube se rétrécit sous le diaphragme, afin de se raccorder à un petit tuyau de caoutchouc ou de plastique souple qui est branché à son autre extrémité sur un tube en plastique destiné à recueillir le filtrat, par l'intermédiaire d'un bouchon traversé par deux petits tubes en verre, l'un relié au tuyau, l'autre servant à laisser l'air s'échapper au travers d'un coton à mesure que le filtrat remplit le tube. Une pince métallique pourvue d'une vis de réglage est disposée sur le tuyau souple ; elle est d'abord fermée lorsque le sang est introduit dans le tube et imbibe la laine de verre, puis ouverte et

réglée de façon que la filtration s'effectue au rythme approximatif de une goutte par seconde. Le résultat de cette filtration est satisfaisant puisque 50 % des polynucléaires sont ainsi retenus par leur adhésivité à la laine de verre, tandis que les lymphocytes passent dans le filtrat avec le sérum et les globules rouges.

(±) La laine de verre - n° 3950 de Corning - est livrée prête à l'emploi, mais devra être stérilisée sur place, et sa manipulation nécessite des précautions (masque et gants) car elle est très irritante.

3/ Sédimentation.

Le filtrat est réparti dans des tubes à essai que l'on bouche, et qui sont disposés, inclinés à 45° environ, dans une étuve où on les laisse entre 30 minutes et 1 heure ; 30 minutes étant un minimum pour obtenir une sédimentation suffisante des globules rouges, et une heure étant un maximum au-delà duquel les lymphocytes vont sédimenter également. Aussi, l'idéal est de retirer les tubes de l'étuve après 45 minutes environ ; le surnageant est alors clair et contient les lymphocytes, ainsi bien sûr qu'un grand nombre de globules rouges mais qui ne seront pas trop gênants. Ce surnageant est alors prélevé à la pipette, et mis dans un flacon à fond rond pour centrifugeuse.

4/ Préparation des lymphocytes.

On complète alors le flacon aux 3/4 avec la solution de Hanks (±), on agite afin de laver les lymphocytes, puis on les sépare en effectuant une centrifugation lente ne dépassant pas

1.800 t/mn, pendant 7 minutes environ. Le surnageant est ensuite aspiré avec précaution à l'aide d'une pipette Pasteur branchée sur une source quelconque de vide par son gros bout, de façon à ne garder que le culot de centrifugation où se trouvent les lymphocytes. On remplit alors de nouveau le flacon avec la solution de Hanks, de façon à procéder à un second lavage selon la même technique. Le culot de centrifugation est alors remis en suspension dans 2 ml de la solution de Hanks.

- (±) La solution de Hanks est une solution saline tamponnée que l'on emploie à titre de solution de survie pour ses propriétés trophiques et nutritives, et qui est fournie par l'Institut Pasteur sous forme de deux ampoules de 30 ml, l'une de solution concentrée de Hanks, l'autre de tampon, et que l'on dilue dans 440 ml d'eau bi-distillée pour obtenir 500 ml de la solution diluée utilisée.

5/ Numération des lymphocytes.

La numération des lymphocytes a pour but de savoir quelle quantité de suspension introduire dans le mélange final pour obtenir un nombre déterminé de lymphocytes. On procède de la façon suivante : dans une pipette-mélangeur de Fiessinger, on réalise une dilution au 1/20ème en aspirant la solution de lymphocytes jusqu'au trait marqué 1, puis un mélange d'acide acétique à 20 % teinté d'une goutte de bleu de méthylène jusqu'au trait marqué 21, on agite, on rejette la première goutte, et on dépose la deuxième sur une cellule de Malassez. Sachant d'une part que la cellule de Malassez est divisée en 100 petits carreaux pour un volume total de 1 mm³, et connaissant d'autre part la dilution utilisée, il est aisé de calculer le résultat recherché

par une simple règle de trois, résultat que l'on exprimera en nombre de lymphocytes par millilitre.

II - Préparation des globules rouges hétérologues.

Cette préparation des globules rouges (GR) étant plus longue que celle des lymphocytes, doit être commencée - et se poursuivre ensuite parallèlement à cette dernière - dès que la filtration du sang et donc la préparation des lymphocytes est en cours.

On utilise des GR de mouton fournis prêts à l'emploi par l'Institut Pasteur de Paris, et présentés sous un double emballage vinylique contenant 5 ml d'une suspension concentrée de GR, préparée selon une méthode voisine de celle décrite par Czimas (57).

1/ Tannage.

5 ml d'une solution mère d'acide tannique à 1/50ème dans de l'eau distillée sont préparés 24 h. à l'avance, et gardés au froid à +4° jusqu'au jour de la manipulation où ils servent à donner, par une dilution au 1/4 suivie de deux dilutions successives au 1/10ème dans du sérum physiologique, une solution à 1/20.000ème.

0,125 ml de la suspension de GR sont alors mélangés dans un tube à essai à 5 ml de la solution d'acide tannique à 1/20.000ème, et laissés en contact pendant 10 minutes environ.

Les GR sont alors lavés trois fois dans un tampon phosphate à pH 7,2 dilué au 1/3 dans du

sérum physiologique, selon la méthode que nous avons déjà décrite à propos du lavage des lymphocytes dans la solution de Hanks, et le dernier culot de centrifugation est remis en suspension dans 5 ml de ce même tampon.

Pour éviter toute altération due au vieillissement des solutions, nous préparons toujours nos tampons extemporanément, par mélange d'une solution de phosphate disodique et d'une solution de phosphate monopotassique.

- Pour le phosphate disodique : dilution de 10,65 g de pur sec ou de 27 g de cristallisé dans 500 ml d'eau distillée.

- Pour le phosphate monopotassique : dilution de 10,20 g dans 500 ml d'eau distillée.

Ces solutions mères ont l'avantage de bien se conserver à froid et de pouvoir ainsi servir pour plusieurs séances.

- Pour obtenir 100 ml de tampon phosphate à pH 7,2, il suffit alors de mélanger 76 ml de la solution mère de phosphate disodique avec 24 ml de la solution mère de phosphate monopotassique,

- Et pour obtenir 10 ml de tampon phosphate à pH 6,4 dont nous verrons l'utilité ci-après, il suffit de mélanger 3,22 ml de la solution mère de phosphate disodique avec 6,78 ml de la solution mère de phosphate monopotassique.

2/ Incubation.

Le ou les antigènes étudiés - c'est-à-dire en pratique le ou les médicaments soupçonnés - sont alors éventuellement solubilisés, puis dilués dans un sérum physiologique de façon à

disposer d'une solution contenant environ 2,5 mg d'antigène par millilitre.

Par ailleurs on prépare des flacons à centrifugeuse, au nombre de un par antigène - ou par dilution d'antigène -, plus un comme témoin, et ceci quel que soit le nombre de malades à étudier, puisque seuls interviennent ici les antigènes qui peuvent donc être communs à plusieurs malades explorés dans la même séance. Bien entendu, si on sait à une séance que l'on aura besoin de plus de cinq flacons, il est bien évident qu'il suffira alors d'augmenter la quantité de GR préparés, en en prenant par exemple le double soit 0,250 ml pour le tannage, afin de resuspendre le culot après lavages dans 10 ml au lieu de 5.

On introduit dans chaque flacon 4 ml de tampon phosphate à pH 6,4 + 1 ml de la solution antigénique - remplacée par 1 ml de sérum physiologique dans le flacon témoin - + 1 ml enfin de la solution de GR tannés. Après avoir bien agité, on laisse le mélange incuber 30 minutes à température ambiante. C'est cette phase que l'on désignera par la suite sous le terme impropre de "sensibilisation", et pendant laquelle les GR sont simplement revêtus par l'antigène.

3/ Préparation des GR sensibilisés.

Les GR sensibilisés sont lavés deux fois selon la technique habituelle avec la solution de Hanks additionnée de NHS ($\pm$) dans la proportion de 10 %, puis le culot de centrifugation est finalement repris dans 2 ml de cette solution.

($\pm$) NHS est le sigle anglo-saxon pour "normal

human serum" ; il s'agit simplement d'un sérum humain décomplémenté par chauffage à 56 ° pendant 30 minutes, qui est ensuite épuisé en éventuels anticorps anti-hématies de mouton - qui pourraient entraîner une réaction faussement positive par un mécanisme direct d'ICA - par contact pendant 1 h. avec 1/6ème de son volume d'une suspension d'hématies de mouton normales, non tannées et non sensibilisées, la séparation se faisant ensuite par centrifugation. Son rôle est trophique.

4/ Numération des GR.

La numération des GR a pour but de savoir quelle quantité de suspension introduire dans le mélange final pour disposer d'un nombre déterminé de GR. Il suffit de réaliser une dilution au centième à l'aide d'une pipette-mélangeur de Thoma ou de Potain, pour obtenir une dispersion suffisante des GR qui permette de les compter dans une cellule de Malassez selon la méthode exposée précédemment pour la numération des lymphocytes.

III - Réalisation du mélange final.

A partir des numérations effectuées, on calcule les volumes correspondant approximativement à 20 millions de GR et à 5 millions de lymphocytes. Ces chiffres peuvent être modifiés en fonction de la lisibilité obtenue dans le mélange final, car c'est leur rapport de 1/4 qui est important, répondant au nombre minimum de GR entourant un lymphocyte pour réaliser une rosette. Ces volumes additionnés ont un total en principe inférieur à 1 ml, et en ajoutant à

ce total 0,1 ml de NHS, il reste encore une certaine quantité à ajouter pour faire 1 ml, quantité que l'on ajoute sous forme de tampon phosphate à pH 7,2. En pratique : on introduit dans des petits tubes à hémolyse le tampon en quantité ainsi calculée, puis le sérum, puis les lymphocytes, et en dernier les GR. Ces tubes sont alors bouchés puis centrifugés à 800 t/mn pendant 10 minutes, avant d'être finalement mis en rotation lente pendant 2 heures environ à température ambiante.

IV - Lecture.

La lecture se pratique sur le mélange réalisé dans le tube, dont une partie est prélevée à la pipette Pasteur pour être déposée sur une cellule de Malassez, où on observe la suspension des cellules au microscope binoculaire, sous un grossissement de 40 à l'objectif et de 8 à l'oculaire. On compte alors dans toute une chambre, c'est-à-dire dans 100 petits carreaux, le nombre de rosettes observées. Sont considérées comme rosettes tous les lymphocytes sur lesquels se trouvent collés au moins quatre GR de mouton. Il est à noter qu'aucune confusion ne peut être faite entre GR de malade et GR de mouton, ces derniers étant nettement plus petits (3 à 5 microns) que les premiers qui, rappelons-le, ont un diamètre d'environ 7 microns. Les rosettes peuvent se présenter soit comme une figure plane lorsque le lymphocyte n'étant entouré que de quelques GR reste visible au milieu, soit comme une petite mûre dont les grains, formés par les GR, cachent par leur nombre et leur disposition le lymphocyte central ; et dans ce cas, seuls la régularité et le volume de cette mûre peuvent faire la différence entre rosettes et agglutinations de GR de mouton, problème dont nous verrons l'importance par la suite.

Le nombre de rosettes observées est alors rapporté à 1.000 lymphocytes par une simple règle de trois, après que l'on ait compté le nombre de lymphocytes observés dans toute une chambre de la cellule de Malassez. Pour cela, il suffit d'effectuer une dilution de moitié de la suspension finale par de l'acide acétique à 2 % teinté d'une goutte de bleu de méthylène, ce qui va permettre de colorer électivement les globules blancs et par suite de compter les lymphocytes. Il est à noter que la même quantité de lymphocytes ayant été théoriquement mise dans chaque tube, cette numération peut n'être pratiquée qu'une seule fois par malade quel que soit le nombre de tubes réalisés, avec une approximation suffisante.

V - Résultats.

Si Cruchaud et Frei prenaient comme critère de positivité une simple différence de 3/1.000, c'est qu'ils trouvaient un nombre de rosettes très inférieur en général aux chiffres que nous avons ordinairement trouvés, et des témoins le plus souvent négatifs ou très faiblement positifs, alors que les nôtres étaient plus souvent et plus fortement positifs, de sorte que pour nous les chiffres moyens de rosettes exprimés pour mille sont beaucoup plus élevés que les leurs, d'où la nécessité de prendre d'autres critères de positivité. Car s'il est en effet possible de considérer par exemple comme significative une différence de 3/1.000 entre 0,7/1.000 et 3,7/1.000, cela devient évidemment sans grande signification entre 10,7/1.000 et 13,7/1.000 ; aussi, nous

avons décidé arbitrairement de fixer comme critère de positivité une différence du simple au double entre le nombre de rosettes trouvées dans les tubes avec GR sensibilisés, et celui trouvé dans le ou les tubes témoins correspondants.

CHAPITRE IV

ANALYSE DES FACTEURS METHODOLOGIQUES

Dès la mise en route de ce test, nous avons pu constater que deux choses n'allaient pas :

- la première, c'est que nos premiers résultats étaient tous négatifs, avec des chiffres importants de rosettes tant dans les tubes témoins que dans les tubes sensibilisés ;
- la deuxième, c'est que la lecture était rendue extrêmement difficile par l'encombrement des champs par des globules rouges humains d'une part, et surtout par la présence d'un très grand nombre d'agglutinats de GR de mouton d'autre part, agglutinats de toutes formes et de toutes tailles mais avec une majorité de petits agglutinats à peu près sphériques, rendant ainsi la distinction parmi eux des rosettes très difficile, et les chiffres ainsi obtenus aléatoires.

Comme il n'était pas difficile d'imaginer que ces deux éléments étaient liés et que nos résultats ne pourraient être pris en considération tant que subsisteraient de telles difficultés de lecture, nous avons décidé de stopper là ce premier essai du test dans un but diagnostic, pour

nous consacrer à une mise au point strictement technique, en étudiant méthodiquement, et malheureusement fastidieusement pour le lecteur, le rôle de chaque élément et de chaque étape de ce test pour essayer de découvrir les modifications nécessaires à l'obtention d'une suspension finale interprétable.

I - Etude du rôle du tannage.

1/ Premier essai : manipulation partielle sans malade.

a) Technique.

Comme nous cherchions surtout à savoir si les solutions d'acide tannique n'entraînaient pas une altération des GR de mouton, nous avons procédé au tannage de ceux-ci à l'aide de solutions à différentes concentrations : 1/20.000ème, 1/50.000ème, 1/100.000ème et 1/200.000ème. Nous plaçons ensuite les flacons à +4° après avoir étudié au microscope les échantillons fraîchement tannés, de façon à pouvoir les observer de nouveau après une nuit de réfrigérateur, en accord avec la technique de Cruchaud et Frei qui procèdent ainsi au tannage la veille de l'expérimentation.

b) Résultats.

Après 10 minutes de contact avec les solutions d'acide tannique et trois lavages successifs dans le tampon phosphate à pH 7,2 dilué au tiers, nous constatons dans les quatre échantillons une bonne dispersion des GR de mouton, ainsi que l'absence de modifications morphologiques pouvant faire penser à une altération de ces cellules. Nous procédons ensuite à un contrô-

le identique le lendemain, mais là nous avons la surprise de constater une altération nette des GR, ceux-ci ayant perdu leur sphéricité au profit de différentes petites figures polyédriques, et présentant une certaine tendance à s'agglutiner. Ces modifications sont identiques pour les quatre concentrations, et comme la justification théorique de ce séjour de 24 heures au froid ne nous paraît pas évidente, nous décidons d'éliminer par la suite cette réfrigération et d'utiliser des GR fraîchement tannés.

2/ Deuxième essai : manipulation effectuée cette fois-ci totalement, et utilisant les lymphocytes d'une malade sensibilisée à la pénicilline.

a) Technique.

Tannage des GR à l'aide de trois solutions d'acide tannique à 1/20.000ème, 1/100.000ème et 1/200.000ème.

Préparation des lymphocytes selon la technique normale décrite au chapitre précédent.

Au total donc, réalisation de six tubes de mélange final : trois tubes de GR sensibilisés différemment tannés, et trois tubes de GR témoins non sensibilisés correspondants.

b) Résultats.

Disons d'emblée que la lecture est rendue difficile par la présence d'agglutinats de GR, et par la présence d'un nombre important de GR humains qui, bien que facilement distingués des autres par leur taille, encomrent cependant le champ et favorisent peut-être par des phénomènes

de surface la survenue d'agglutinats. La différenciation entre rosettes et petits agglutinats est en effet très aléatoire, comme le prouvent les résultats très différents obtenus à la lecture d'une même chambre par trois personnes différentes qui trouvent ainsi respectivement 7, 12 et 23 rosettes !

Dans l'ensemble cependant, les résultats obtenus pourraient paraître satisfaisants puisque l'on obtient les chiffres suivants :

<u>GR de mouton sensibilisés (GRMS)</u>	<u>Nombre de rosettes trouvées par champ</u> (moyenne entre plusieurs <u>lecteurs</u>)
tannage 1/20.000ème	14,5 rosettes soit 9,6 0/00
tannage 1/100.000ème	25 rosettes soit 16,6 0/00
tannage 1/200.000ème	14 rosettes soit 9,3 0/00
<u>GR de mouton non sensibilisés (témoins)</u>	
tannage 1/20.000ème	2 rosettes soit 1,3 0/00
tannage 1/100.000ème	4 rosettes soit 2,6 0/00
tannage 1/200.000ème	5 rosettes soit 3,3 0/00

c) Discussion.

Ces résultats favorables appellent une certaine réserve quant à leur validité. En effet, du fait que l'on peut compter ou non comme rosette bon nombre d'agglutinats et vice-versa, et du fait que cette lecture est faite en sachant si la préparation que l'on étudie est ou

n'est pas sensibilisée, il est difficilement évitable d'en être influencé dans un sens ou dans un autre selon notre méfiance, quand s'offre une telle liberté d'interprétation. Il conviendra donc au prochain essai d'effectuer la lecture sans connaître la nature de la suspension étudiée. Par ailleurs, l'échantillon sensibilisé tanné à 1/100.000ème semble donner plus de rosettes que les deux autres, ce qui sera à vérifier.

3/ Troisième essai : manipulation effectuée avec les lymphocytes d'un malade sensibilisé à la pénicilline, et lecture "en aveugle".

a) Technique.

Même technique qu'à la séance précédente, mais en réduisant les essais d'acide tannique à deux solutions : 1/20.000ème et 1/100.000ème. Lecture "en aveugle" des quatre échantillons ainsi obtenus, par marquage par une tierce personne.

b) Résultats.

On note tout d'abord les mêmes difficultés de lecture qu'à la séance précédente : présence gênante de GRH et d'agglutinats en grand nombre. On constate ensuite après lecture que les résultats sont discordants puisque l'on trouve les chiffres suivants :

Tannage 1/20.000ème :

GRMS 10 rosettes soit 6,6 0/00

témoin 4 rosettes soit 2,6 0/00

Tannage 1/100.000ème :

GRMS	11 rosettes soit 6,9 0/00
témoin	27 rosettes soit 18 0/00

Ainsi nous avons un résultat positif dans un cas, et un résultat négatif dans l'autre.

c) Discussion.

S'il se confirme que le nombre de rosettes obtenues en fonction du tannage est plus important pour la concentration de 1/100.000ème, il faut tenir compte du chiffre important de rosettes trouvé dans le tube témoin à 1/100000e chiffre difficile à expliquer en dehors d'une très improbable erreur de marquage des tubes. On décide donc de pratiquer un nouvel essai sur ces mêmes bases techniques, mais en essayant cependant de faciliter la lecture par une lyse des GRH.

4/ Quatrième essai : manipulation utilisant les lymphocytes d'une malade sensibilisée à la pénicilline, avec lyse des GR humains.

a) Technique.

Même technique qu'à la séance précédente, mais en effectuant en plus une lyse des GRH réalisée de la façon suivante : lorsque la préparation des lymphocytes est terminée, c'est-à-dire après les deux lavages successifs dans la solution de Hanks (voir ci-avant chapitre III, paragraphe I, 4), le culot de centrifugation contenant les lymphocytes est normalement remis en suspension dans 2 ml de la solution de Hanks ; on ajoute alors dans le flacon trois volumes pour un - soit donc ici 6 ml - d'eau bi-distillée, que l'on mélange en

agitant doucement. Le contact des globules rouges avec l'eau distillée fait éclater la membrane de ces derniers et entraîne leur lyse, avant que ne soient altérés à leur tour les lymphocytes qui sont plus résistants. Le temps de contact avec l'eau distillée est donc très important, et doit être scrupuleusement respecté si l'on veut obtenir un résultat satisfaisant sans pour autant perdre de lymphocytes ; aussi, au bout de 30 secondes exactement, on rétablit la salinité normale de la solution en ajoutant dans le flacon un volume pour un - soit ici donc 2 ml - de sérum salé hypertonique à 35 0/00, et on agite. On procède alors à une centrifugation suivie d'un nouveau lavage dans la solution de Hanks, et le culot est finalement repris dans 2 ml de la solution de Hanks. Afin de contrôler les effets produits par cette lyse des hématies, nous ne l'avons appliquée qu'à une moitié de la quantité de sérum recueillie, l'autre moitié non lysée nous servant de témoin.

b) Résultats.

Disons tout d'abord que nous avons trouvé sensiblement le même nombre de lymphocytes à la numération des échantillons lysés qu'à celle des échantillons non lysés : environ (en arrondissant les chiffres) 1.800 lymphocytes par lame dans les tubes non lysés, contre 1.600 dans les tubes lysés, soit une perte assez faible. Ensuite, nous avons pu constater avec satisfaction lors de la lecture finale des huit tubes ainsi obtenus que celle-ci était singulièrement facilitée dans les quatre tubes lysés par l'éclaircissement du champ ainsi obtenu, et malgré la présence persistante de nombreux agglutinats. Malheureusement, les résultats obte-

mus sont loin, eux, d'être aussi intéressants si l'on en juge par les chiffres suivants :

		Nombre de	0/00
		<u>rosettes</u>	
Tannage 1/20.000ème :			
GRMS	{ avec lyse	30	18,7
	{ sans lyse	18	10
témoins	{ avec lyse	5	3,1
	{ sans lyse	21	11,6
Tannage 1/100.000ème			
GRMS	{ avec lyse	65	40,6
	{ sans lyse	43	23,8
témoins	{ avec lyse	53	33,1
	{ sans lyse	27	15

Aussi, nous décidons qu'avant de discuter il serait prudent de refaire un autre essai selon les mêmes modalités techniques et en utilisant les lymphocytes d'un malade sensibilisé à la pénicilline, pour comparer les résultats avant de conclure trop hâtivement à une défaillance technique.

c) Résultats.

On peut dire que les résultats obtenus sont satisfaisants dans la mesure où ils concordent avec ceux trouvés précédemment, ce qui revient à dire qu'ils ne sont pas plus significatifs ; on trouve en effet les chiffres suivants :

		<u>Nombre de rosettes</u>	<u>o/oo</u>
Tannage 1/20.000ème :			
GRMS	{ avec lyse	22	14,6
	{ sans lyse	4	3,2
témoins	{ avec lyse	11	7,3
	{ sans lyse	17	13,6

Tannage 1/100.000ème			
GRMS	{ avec lyse	24	16
	{ sans lyse	43	34,4
témoins	{ avec lyse	33	22
	{ sans lyse	49	39,2

d) Discussion.

La première constatation à faire à la vue de ces chiffres, nous semble être le nombre important de rosettes trouvées tant dans les échantillons sensibilisés que dans les témoins.

La deuxième constatation est que les résultats ne sont pas plus significatifs dans les tubes lysés que dans les autres, malgré la facilité de lecture ainsi obtenue ; mais comme nous avons pu constater par ailleurs que la lyse n'entraînait ni altération évidente, ni perte marquante des lymphocytes, il nous semble que la facilité de lecture obtenue mérite qu'on l'utilise désormais dans les manipulations ultérieures. Ce point étant acquis, reste encore celui du tannage : le total des rosettes comptées dans les tubes tannés à 1/100.000ème s'élève à 337, contre 128 rosettes dans les tubes tannés

à 1/20.000ème, ce qui confirme l'impression que l'on avait aux précédents essais. Mais finalement, pour ne plus avoir à compliquer ces essais par l'emploi de ces différentes concentrations d'acide tannique, nous décidons d'opter en définitive pour une concentration à 1/50.000ème, compromis basé sur les très vagues considérations suivantes : la concentration à 1/20.000ème nous paraît un peu forte et susceptible d'entraîner malgré tout une certaine altération des GRM, tandis que la concentration à 1/100.000ème nous paraît à l'inverse trop faible pour pouvoir remplir efficacement son rôle théorique de fixateur ($\pm$). Enfin, reste le problème des agglutinats qui se sont montrés aussi nombreux à peu de chose près dans tous les tubes examinés, problème qui rejoint probablement celui posé par ces chiffres trop importants de rosettes trouvées dans les tubes témoins, et qui traduisent vraisemblablement une agglutination non spécifique. Mais comme il ne nous semble pas, après ces essais, que le tannage intervienne dans la formation de ces agglutinats, nous décidons de continuer des essais centrés sur la recherche de la cause, ou des causes, qui pourraient être à leur origine.

- ($\pm$) Nous avons appris récemment que Cruchaud et Frei avaient eux aussi adopté la concentration de 1/50.000 ème pour le tannage, pour un problème d'agglutinats que nous ne sommes donc pas seuls à avoir.

II - Etude du rôle du NHS.

Manipulation effectuée à l'aide des lymphocytes d'une malade sensibilisée à la pénicilline.

1/ Technique.

Cruchaud et Frei signalaient dans leur publication qu'ils avaient remplacé à la fin - mais sans en préciser clairement la raison - le NHS par le PPL II, PPL II désignant un plasma humain dépourvu de gamma-globulines et de facteurs de coagulation, préparé par la Croix-Rouge suisse ($\pm$).

Ce produit est déjà intéressant dans la mesure où il est livré stérile et prêt à l'emploi dans des flacons de 250 ml, ce qui évite toutes les manipulations nécessaires à la préparation du NHS. Nous avons donc commandé ce produit, et lorsque nous le reçûmes, nous le répartîmes stérilement dans des petits flacons de 5 ml qui furent ensuite conservés au froid à $+4^{\circ}$ selon les indications du fabricant, ceci afin de pouvoir disposer à tout moment de petites quantités de ce produit sans pour autant manipuler à chaque fois le grand flacon de 250 ml, ce qui l'aurait inévitablement et rapidement contaminé et donc altéré, le rendant inutilisable. Nous avons donc utilisé pour cet essai : PPL II, tannage à 1/50.000ème, lyse des hématies et bien sûr, lecture "en aveugle".

($\pm$) Swiss Red-Cross, Wankdorfstrasse 10, 3000 - Bern.

2/ Résultats.

Nous obtenons là pour la deuxième fois un résultat franchement positif, puisque l'on trouve les chiffres suivants :

- GRMS 19 rosettes, soit 21,6 0/00
- témoin 4 rosettes, soit 4,4 0/00

Malheureusement la lecture reste aléatoire, car le problème des agglutinats n'est toujours pas résolu ; or, c'est justement ce problème que nous espérons résoudre grâce à l'emploi du PPL II. Il faut donc considérer cette séance comme un échec, et chercher de nouveau quelle peut bien être la cause de ces agglutinations des GRM. Mais de toutes façons, l'emploi du PPL II s'étant révélé pratique, nous l'emploierons désormais à la place du NHS dans les prochains essais.

III - Etude du rôle du conditionnement des GRM.

Manipulation effectuée à l'aide des lymphocytes d'un malade sensibilisé à la pénicilline.

1/ Technique.

Sur les conseils de Melle Stiffel, - que nous remercions ici de nous avoir aidés si souvent - nous avons pensé que le traitement subi par les GRM avant leur emballage à l'Institut Pasteur, pouvait d'une façon ou d'une autre intervenir dans la formation de ces agglutinats, et qu'il serait utile de les laver avant leur emploi. C'est donc ce que nous avons fait dans cette séance, conservant par ailleurs les mêmes modalités techniques qu'à la séance précédente. Pour cela, nous avons versé les GRM contenus dans l'emballage vinylique dans un flacon à centrifugeuse, que nous avons alors rempli par du tampon phosphate à pH 7,2 dilué au tiers dans du sérum physiologique. Après agitation et centrifugation, nous avons procédé à un second lavage effectué dans les mêmes conditions, et le culot de centrifugation ainsi obtenu a été

utilisé normalement pour la suite, comme l'étaient auparavant les GRM prélevés directement dans leur sachet.

2/ Résultats.

Nous avons pu constater que cette modification technique ne modifiait pas du tout notre problème, puisque les agglutinats se sont montrés tout aussi nombreux qu'à l'ordinaire, entraînant les mêmes difficultés habituelles de lecture, et par conséquent les mêmes chiffres aléatoires de rosettes observées. Le résultat obtenu cette fois-ci n'est d'ailleurs même pas significatif comme à la dernière séance, avec un nombre sensiblement égal de rosettes comptées dans les deux tubes. Cependant là encore, cette modification technique nous paraissant souhaitable d'un point de vue théorique, nous l'adopterons désormais pour toutes les séances ultérieures.

IV - Etude du rôle de la centrifugation finale.

Manipulation effectuée avec les lymphocytes d'un malade sensibilisé à la pénicilline.

1/ Technique.

Toujours à la recherche de la cause de ces agglutinats de GRM, nous avons pensé que la centrifugation effectuée sur le mélange final avant la mise en rotation lente, dans le but précisément de réaliser un contact étroit entre les cellules, pourrait être une cause mécanique à ces agglutinations. Nous avons donc décidé de la supprimer, et de lui substituer une simple mise en rotation rapide remplaçant les deux opérations successives : centrifugation et mise en

rotation lente. Cette rotation rapide est effectuée pendant deux heures environ à 20 t/mn. C'est donc cette technique que nous avons appliquée au cours de cette séance, conservant par ailleurs sans changement la technique mise en oeuvre lors de l'essai précédent.

2/ Résultats.

Cette modification pas plus que les précédentes n'entraîne l'effet escompté : la lecture là encore se heurte à la présence d'agglutinats, aussi nombreux dans les deux tubes. Cette modification est donc un échec, mais comme les modifications précédentes, nous l'adopterons néanmoins pour la suite de ces essais, car elle constitue une simplification.

V - Etude du rôle de la propreté du matériel.

Pour marquer une pose dans cet exposé nécessairement un peu fastidieux - ce dont nous nous excusons de nouveau - nous allons dire quelques mots du matériel employé.

Certains lecteurs pourraient en effet penser que la cause de tous nos ennuis provient peut-être d'un défaut de lavage du matériel, laissant subsister par exemple une certaine quantité de détergent séché, déposé sur les parois de verre des tubes, des pipettes, ou des flacons employés. Or, s'il nous est bien arrivé d'avoir la même idée, il se trouve en réalité qu'il n'en est rien pour la raison suivante : le matériel employé a toujours été celui préparé en vue de la réalisation du TTL, et au cours de l'exécution de ce test où est, rappelons-le, effectuée une culture de lymphocytes, toute

trace de détergent suffit - comme les premières personnes à avoir expérimenté ce test ont pu s'en apercevoir à leurs dépens - à lyser les lymphocytes. Aussi, la préparation du matériel est-elle toujours réalisée avec soin de la façon suivante : après un premier lavage à l'eau ordinaire, un lavage complémentaire est effectué à l'aide d'un détergent spécial, le 7X ($\pm$), et on rince ensuite plusieurs fois à l'eau ordinaire avant de terminer par un rinçage à l'eau distillée d'abord, puis bi-distillée ensuite. On obtient ainsi un matériel à la fois propre grâce à l'emploi d'un détergent, et pur grâce à ces nombreux rinçages successifs. Tout le matériel est ensuite stérilisé, le verre à la chaleur sèche, le caoutchouc et le plastique à la chaleur humide.

($\pm$) Le 7X est un détergent américain importé par les établissements Becton et Dickson, et distribué par la pharmacie Canonne.

Enfin, bien que ce test de la rosette ne nécessite pas comme le TTL des précautions particulières d'asepsie, puisqu'on n'y effectue pas de culture, il va sans dire que nous n'avons fait que profiter sans en abuser de cet avantage, effectuant le plus "proprement" possible toutes nos manipulations.

VI - Etude du rôle de la solution de Hanks.

1/ Premier essai : manipulation purement technique, effectuée sans malade.

a) Technique.

Notre but étant toujours de découvrir la cause de l'agglutination des GRM, nous avons

décidé de consacrer une séance particulière à sa recherche, en procédant de la façon suivante : nous avons effectué l'ensemble de la manipulation selon les modalités techniques adoptées lors de l'essai précédent, mais en procédant à chaque étape aussi minime soit-elle, comme par exemple après chaque centrifugation, à un contrôle au microscope de l'état des GRM. Et bien que cette façon de procéder nous soit parue sur le moment un peu fastidieuse, nous avons regretté rapidement de ne pas y avoir recouru plus tôt, car c'est elle qui nous a finalement apporté la solution.

b) Résultats.

Quelle n'a pas été en effet notre surprise de constater que des agglutinats apparaissent après le lavage des GRM sensibilisés - ou des GRM non sensibilisés dans le tube témoin - avec la solution de Hanks ! (voir ci-avant chapitre III, paragraphe II, 3).

Jamais je crois nous n'aurions envisagé de nous-mêmes la responsabilité de cette solution tamponnée, trop bien et trop anciennement connue pour nous paraître suspecte. Bien entendu, il ne nous est pas possible de concevoir une explication cohérente à ce phénomène, que nous nous bornerons donc à enregistrer, tout en ayant hâte de vérifier ces résultats dans un essai normal réalisé avec des lymphocytes d'un malade. Tout au mieux peut-on envisager comme mécanisme responsable, des modifications ioniques dues à la charge de certains éléments composant le milieu de Hanks, et entraînant une agglutination par un phénomène d'augmentation de la tension superficielle, dans le cadre des lois d'attraction moléculaire de Van der Waals.

2/ Deuxième essai : manipulation effectuée avec le sérum d'une malade sensibilisée à la pénicilline.

a) Technique.

Après avoir pris l'avis de Melle Stiffel, nous avons décidé bien entendu de supprimer tout emploi de la solution de Hanks, tant au cours de la préparation des lymphocytes qu'au cours de celle des GRM, et de la remplacer tout simplement par notre tampon phosphate dilué au tiers. Pour le reste, la manipulation s'est faite selon les mêmes modalités techniques qu'auparavant.

b) Résultats.

Cette méthode est bien un succès dans la mesure où elle nous permet de confirmer les conclusions tirées de l'essai précédent, par la lecture de lames totalement dépourvues du moindre agglutinat. Des rosettes sont présentes, parfaitement reconnaissables, et que l'on peut compter sans aucune difficulté. Malheureusement ce succès s'annonce comme purement technique, car pour ce qui est du résultat diagnostique escompté, nous le trouvons négatif, avec même un peu plus de rosettes dans le tube témoin que dans le tube sensibilisé.

VII - Etude du rôle de la dose de l'antigène.

Sur les conseils du Dr Ky, et en se référant à la technique du TTL, nous décidons de continuer notre expérimentation selon les mêmes modalités techniques puisque celles-ci nous paraissent satisfaisantes d'un point de vue strictement matériel, mais en essayant désormais plu-

sieurs concentrations différentes en antigène. En effet, ce problème des doses d'antigène à employer a été une des principales difficultés rencontrées lors de la mise au point du TTL, et on peut lire dans la thèse de C. Pinon (39) : "... la concentration (en antigène) idéale, donnant la meilleure stimulation, varie avec chaque médicament, mais varie peu pour un médicament donné. Ainsi par exemple, la concentration efficace pour la pénicilline est de 1.000 U.I./ml ; au-dessous de cette dose optimale la stimulation est faible, et affecte sans doute un trop petit nombre de cellules pour pouvoir être décelés, et au-dessus de cette concentration, il n'existe pas une transformation uniforme traduite par une courbe en plateau comme on pourrait s'y attendre : il se produit au contraire une baisse de la stimulation cellulaire jusqu'à 3.000 U.I./ml, et au-delà de cette concentration les lymphocytes sont en souffrance, et certains même sont déjà lysés".

Ceci nous montre bien que la concentration en antigène intervient indiscutablement dans le mécanisme de ce test, et que ce problème est en outre délicat à régler. Il était donc tentant d'extrapoler à notre test ce problème révélé par le TTL, d'autant que nous n'avons pas trouvé autre chose à incriminer dans la faillite de nos résultats. Nous avons donc pratiqué un certain nombre d'essais avec des malades sensibilisés à la pénicilline, en utilisant à chaque fois diverses concentrations de cet antigène. Rappelons que nous avons utilisé jusqu'ici une dose voisine de 2,5 mg dans 1 ml, ou plus exactement pour des raisons pratiques de dilution, une dose de 2,4 mg soit, puisque 1 million d'unités de pénicilline correspondent à 600 mg, une concentration de 4.000 U.I./ml.

Voici à titre d'exemple, les premiers résultats obtenus :

		Résultats exprimés en
		<u>0/00</u>
<u>- Premier malade</u>		
	0,6 mg soit 1.000 U.I./ml	4 0/00
GRMS	6 mg soit 10.000 U.I./ml	1,7 0/00
	12 mg soit 20.000 U.I./ml	3,4 0/00
témoin		3,4 0/00
<u>- Deuxième malade</u>		
	0,12mg soit 200 U.I./ml	6,3 0/00
GRMS	12 mg soit 20.000 U.I./ml	2,8 0/00
témoin		4,2 0/00
<u>- Troisième malade</u>		
	0,12mg soit 200 U.I./ml	1,2 0/00
GRMS	1,2 mg soit 2.000 U.I./ml	5,4 0/00
	6 mg soit 10.000 U.I./ml	3,6 0/00
Témoin		3 0/00
<u>- Quatrième malade</u>		
	1,2 mg soit 2.000 U.I./ml	9,6 0/00
GRMS	12 mg soit 20.000 U.I./ml	7,2 0/00
témoin		3,2 0/00

Voici enfin un résultat positif !

- Cinquième malade

	1,2 mg soit	2.000 U.I./ml	5	0/00
GRMS	12 mg	soit 20.000 U.I./ml	5,7	0/00
témoin			12,8	0/00

Arrêtons-nous ici sur ce quatrième résultat négatif, pour dire que toutes les manipulations ultérieures ont été faites ainsi en employant plusieurs concentrations différentes en antigène, et qu'elles nous ont permis malheureusement de confirmer ce que l'on peut déjà tirer de ces cinq premiers cas, à savoir qu'il n'est pas possible d'établir un rapport valable entre la concentration utilisée et le nombre de rosettes obtenues, et que les résultats dits "significatifs", c'est-à-dire où l'on trouve deux fois plus de rosettes dans un des tubes sensibilisés que dans le tube témoin, sont des effets du hasard. En effet, les chiffres de rosettes observées dans le tube témoin étant généralement élevés, et parfois même supérieurs au double du chiffre le plus élevé trouvé dans un des tubes sensibilisés comme au cas du cinquième malade, on est bien obligé de considérer dans ces cas que ces rosettes ainsi obtenues ne sont que le résultat d'un ensemble d'actions physico-chimiques et mécaniques qui concourent à les former, indépendamment de toute sensibilisation, et que dans cette optique-là, on a autant de chances de trouver deux fois plus de rosettes dans le tube témoin que dans le tube sensibilisé, et vice versa.

Nous tenons d'ailleurs à signaler dès à présent que dans l'exposé qui sera fait au chapitre suivant des trente cas que nous avons sélectionnés pour la "correction" de leur réalisation technique, exposé qui représente le centre de ce

travail puisque c'est de lui que nous pourrons nous permettre de tirer - en grande partie du moins - nos conclusions, le pourcentage de rosettes trouvées que nous indiquerons pour le tube sensibilisé, sera en réalité le chiffre le plus élevé de ceux relevés en fonction des différentes concentrations en antigène essayées à chaque fois. Cette position se justifie pour deux raisons :

- la première, illogique, repose sur notre espoir d'obtenir ainsi plus de résultats positifs, ce qui va dans le sens de notre désir initial, avoué ou non, de confirmer la valeur de ce test qui semble si bien réussir avec ses promoteurs ;
- la deuxième, logique, repose sur le fait que si par hasard une concentration optimale existe, - bien qu'elle nous ait toujours échappée - ses résultats favorables ne nous soient pas masqués par une moyenne effectuée sur l'ensemble des résultats obtenus, et par conséquent abaissée par un ou plusieurs chiffres défavorables.

En procédant ainsi, nous mettons donc un peu artificiellement toutes les chances du côté nécessaire pour obtenir des résultats positifs ; or, nous allons voir pourtant dans le chapitre suivant, combien ces derniers se sont montrés peu nombreux.

CHAPITRE V

EXPOSE DETAILLE DE 30 CAS

1/ Mme BOU... 43 ans

PENICILLINE

Plusieurs épisodes d'oedème de Quincke avec oedème laryngé, et un choc anaphylactique, à la suite de divers traitements comportant des antibiotiques : pénicilline, flabelline, cathomycine, rovamycine et terramycine. A signaler en plus quelques épisodes de coryza spasmodique avec asthme, toujours lors de l'emploi des mêmes produits.

- Tests cutanés : (cuti-réactions) Très forte réaction locale et surtout générale : choc anaphylactique, lors de la réalisation du test avec la pénicilline.

- TTL : positif à la pénicilline

- <u>Rosette</u> : GRMS	11,8 0/00
Témoin	2,4 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

2/ Mr PAI... 37 ans

PENICILLINE

Choc anaphylactique 15 minutes après absorption d'un comprimé de pénicilline V (Oracilline) à un million d'unités.

- Tests cutanés : non pratiqués

- TTL : positif à la pénicilline

- Rosette : GRMS 6,9 0/00
Témoin 10,3 0/00

Résultat NON significatif

o

3/ Mr PAI... 37 ans - 2ème essai

GRMS 2,7 0/00
Témoin 2,5 0/00

Résultat NON significatif

o

4/ Mme BOS... 27 ans

PENICILLINE

Plusieurs épisodes d'urticaire avec oedème de Quincke, et un choc anaphylactique, à la suite de divers traitements comportant des antibiotiques.

- Tests cutanés : (cuti-réactions) Positifs
à la pénicilline

- TTL : positif à la pénicilline

- Rosette : GRMS 23,2 0/00
Témoin 15,7 0/00

Résultat NON SIGNIFICATIF

o

5/ Mme REC... 35 ans

PENICILLINE

Plusieurs épisodes d'urticaire au niveau du visage et des mains, chez une ouvrière travaillant à la fabrication de pénicilline.

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline
- Rosette : GRMS 17 0/00
 Témoin 20,5 0/00

Résultat NON SIGNIFICATIF

o

6/ Mme REC... 35 ans - 2ème essai

GRMS	7,2 0/00
Témoin	1,6 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

7/ Mme LEY... 53 ans

PENICILLINE

Manifestations allergiques nombreuses et anciennes - depuis l'âge de 18 ans - à base d'asthme, d'urticaire et d'œdème de Quincke. Clinique assez confuse, ne permettant pas d'incriminer avec certitude un allergène.

- Tests cutanés (cuti-réactions) : Très grosse réaction (++++) à la pénicilline
- TTL : positif à la pénicilline
- Rosette : GRMS 37,6 0/00
 Témoin 5,4 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

8/ Mr BOV... 61 ans

PENICILLINE

Oedème de Quincke quelques heures après une injection intra-musculaire de pénicilline-streptomycine.

- Tests cutanés : non pratiqués.

- TTL : positif à la pénicilline

- <u>Rosette</u> : GRMS	7,9 0/00
Témoin	0 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

9/ Mr HER... 59 ans

PENICILLINE

Erythrodermie : suspicion de plusieurs allergènes, dont la pénicilline.

- Tests cutanés : non pratiqués.

- TTL : NEGATIF à la pénicilline

- <u>Rosette</u> : GRMS	10,6 0/00
Témoin	6 0/00

Résultat presque positif, en désaccord avec le TTL négatif.

o

10/ Mr DOR... 42 ans

PENICILLINE

Apparition d'une éruption cutanée isolée après plusieurs injections de pénicilline lors du traitement d'une syphilis. Disparition en quelques jours après l'arrêt du traitement.

- Tests cutanés : non pratiqués

- TTL : positif à la pénicilline

- <u>Rosette</u> : GRMS	18,4 0/00	Résultat NON
Témoin	10 0/00	significatif

13/ Mr DEL... 51 ans

PENICILLINE

1963 : Urticaire 24 h. après une injection
intra-musculaire de pénicilline

1964 : choc anaphylactique 20 minutes après
une injection IM de pénicilline

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline
- Rosette : GRMS 6,3 0/00
 Témoin 4,2 0/00

Résultat NON significatif

o

14/ Mr GON... 41 ans

PENICILLINE

Urticaire géant 6 jours après la dernière
piqûre d'une série de 6 injections de pénicilli-
ne-streptomycine.

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline
 négatif à la streptomycine
- Rosette : GRMS 5,4 0/00
 Témoin 3 0/00

Résultat NON significatif

o

15/ Mme LEF... 72 ans

PENICILLINE

Erythrodermie au septième jour d'un traite-
ment par l'ampicilline

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline

- Rosette : GRMS 9,6 0/00
Témoin 3,2 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

16/ Mme SAU... 28 ans

PENICILLINE

Pas de renseignements cliniques.

- TTL : positif à la pénicilline
- Rosette : GRMS 5,3 0/00
Témoin 12,8 0/00

Résultat NON significatif

o

17/ Mme COU... 67 ans

PENICILLINE

Clinique confuse à base d'eczéma du visage,
des oreilles et des cuisses

- Tests cutanés : (épidermo-réaction) négatifs
à la pénicilline
- TTL : positif à la pénicilline
- Rosette : GRMS 4,7 0/00
Témoin 2,8 0/00

Résultat NON significatif

o

18/ Mme DES... 41 ans

PENICILLINE

Urticaire avec oedème de Quincke après une
injection de pénicilline et un épisode identique
après une injection de pénicilline-streptomycine

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline
négatif à la streptomycine

- | | | | |
|--------------------|--------|-----|------|
| - <u>Rosette</u> : | GRMS | 2,6 | 0/00 |
| | Témoin | 4 | 0/00 |

Résultat NON Significatif

Q

19/ Mme PIN... 38 ans

PENCILLINE

Clinique très nette : urticaire et oedème de Quincke à la pénicilline

- Tests cutanés : positifs à la pénicilline
- Test de Shelley : négatif à la pénicilline au 1/100e
négatif à la péniciloyl-polylysine au 1/100e
- TTL : non pratiqué
- Rosette : GRMS 3,1 0/00
Témoin 3,1 0/00

Résultat NON significatif

Q

20/ Mme LAV... 31 ans

PENCILLINE

Oedème de Quincke quelques minutes après une première injection de didromycine-bipénicilline (pénicilline + streptomycine + procaïne)

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif à la pénicilline
 négatif pour streptomycine et procaïne
- Rosette : GRMS 5,2 0/00
 Témoin 2,9 0/00

Résultat NON significatif

O

21/ Mr WAS... 39 ans

PENICILLINE

Allergie immédiate - urticaire - et retardée - nouvelle éruption au 8ème jour - après la prise de comprimés d'ampicilline.

- Tests cutanés (cuti-réactions) : positifs pour pénicilline et ampicilline

- TTL : positif à la pénicilline

- <u>Rosette</u> : GRMS	7,8 0/00
Témoin	6,5 0/00

Résultat NON significatif

o

22/ Mr LAP... 39 ans

ASPIRINE

Crises d'asthme à 10 reprises, une heure environ après l'ingestion de comprimés d'aspirine. Clinique très nette.

- Tests cutanés (cuti-réactions) : négatifs

- TTL : non pratiqué

- <u>Rosette</u> : GRMS	3,5 0/00
Témoin	0 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

23/ Mme RAF... 29 ans

ASPIRINE

Urticaire géante et tenace à la suite de l'ingestion d'un comprimé de Véralydon (aspirine + phénacétine + caféine + codéthyline)

- Tests cutanés : non pratiqués

- TTL : positif pour aspirine et phénacétine
négatif pour caféine et codéthyline

- Rosette : GRMS 57 0/00
 Témoin 19,5 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

24/ Mme MAL... 38 ans

ASPIRINE

Allergie clinique très nette à l'aspirine

- Tests cutanés : douteux

- TTL : non pratiqué

- Rosette : GRMS 1,8 0/00
 Témoin 0,3 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

25/ Mme MAL... 38 ans
(même malade)

OVALBUMINE

Urticaire ancienne et cliniquement évidente
aux oeufs

- Tests cutanés (intra-dermo-réactions) : posi-
tifs +++ au blanc d'oeuf à 1/1.000e

- TTL : positif pour ovalbumine
 négatif pour jaune d'oeuf

- Rosette : GRMS 2,8 0/00
 Témoin 0,3 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

o

26/ Mr HAF... 21 ans

OVALBUMINE

Urticaire ancienne et cliniquement éviden-
te aux oeufs.

- Tests cutanés : non pratiqués
- TTL : positif pour ovalbumine et jaune d'oeuf
- Rosette : GRMS 2,1 0/00
 Témoin 4,3 0/00

Résultat NON significatif

o

27/ Mme ZAN... 29 ans POLLEN DE GRAMINEES

Pollinose typique cliniquement

- Tests cutanés (cuti-réactions) : positifs ++++
- TTL : non pratiqué
- Rosette : GRMS 0 0/00
 Témoin 0 0/00

Résultat NON significatif

o

28/ Mme TRA... 44 ans POLLEN de GRAMINEES

Pollinose typique cliniquement

- Tests cutanés (cuti-réactions) : positifs +++
- TTL : non pratiqué
- Rosette : GRMS 1,5 0/00
 Témoin 2 0/00

Résultat NON significatif

o

29/ Mr CAR... 39 ans POLLEN DE GRAMINEES

Pollinose typique cliniquement

- Tests cutanés (cuti-réactions) : positifs ++++

- TTL : non pratiqué

- Rosette : GRMS 32,1 0/00
 Témoin 19 0/00

Résultat NON significatif

o

30/ Mme LEC... 57 ans

PHENYLBUTAZONE

Erythrodermie généralisée à la suite d'un
traitement par la phénylbutazone

- Tests cutanés : non pratiqués

- TTL : positif à la phénylbutazone

- Rosette : GRMS 4 0/00
 Témoin 1,3 0/00

Résultat SIGNIFICATIF

-:-

CHAPITRE VI

DISCUSSION

I - Etude de quelques chiffres tirés des résultats obtenus dans l'étude de ces 30 cas.

1/ Le nombre de cas positifs, ou plutôt significatifs, c'est-à-dire venant confirmer l'allergie telle qu'elle est définie à la fois par la clinique et les tests, dont le TTL en particulier, s'établit globalement à 11 cas sur 30, soit environ $1/3$ des cas. La défaillance du test "des rosettes" apparaît d'autant plus flagrante, que les cas ont été choisis justement pour la quasi-certitude que l'on avait de la réalité de l'allergie explorée.

2/ Le nombre de cas significatifs concernant l'allergie à la pénicilline, fournit un pourcentage encore plus défavorable puisqu'il s'établit à 6 cas sur 21, soit nettement moins que $1/3$ des cas.

3/ Le nombre de cas significatifs concernant les autres allergènes est globalement plus favorable, puisqu'il se monte à 5 cas sur 9, mais le nombre de cas explorés est trop faible pour que l'on puisse en tirer une conclusion valable.

Ces 9 cas se répartissent en effet ainsi :

- 3 cas positifs sur 3 pour l'aspirine
- 3 cas négatifs sur 3 pour le pollen de graminées
- 1 cas positif sur 2 pour l'ovalbumine
- 1 cas positif et unique pour la phénylbutazone

Etant donnée la variabilité des résultats trouvés sur l'ensemble des cas et sur l'échantillon allergique à la pénicilline en particulier, et compte tenu du petit nombre de cas explorés, il est difficile de ne pas attribuer au seul hasard la possibilité d'obtenir 3 cas positifs à l'aspirine, comme 3 cas négatifs au pollen de graminées.

4/ A propos des 11 cas significatifs, on peut faire la remarque suivante : la qualité principale des témoins doit être de toute évidence un pourcentage de rosettes trouvées aussi faible que possible ; or, ces 11 cas significatifs peuvent être réduits à 8 cas que nous qualifierons de "favorables" dans cette optique, et comportant un témoin inférieur à 5 0/00, les trois autres cas ayant un témoin supérieur à 5 0/00 sont plus "discutables".

5/ Toujours à propos de la valeur des témoins, on peut relever les chiffres suivants :

- 7 cas sur 30 comportent un témoin égal ou supérieur à 10/1.000, et
- 11 cas sur 30 comportent un témoin égal ou supérieur à 5/1.000, ce qui est beaucoup puisque l'on rejoint dans ce dernier cas le chiffre de cas significatifs.

Enfin, dans le même ordre d'idée, 8 cas sur 30 ont un pourcentage de rosettes dans le tube sensibilisé inférieur à celui trouvé dans le tube témoin.

6/ D'autres chiffres intéressants sont ceux obtenus artificiellement en additionnant les résultats tels qu'ils sont exprimés pour mille, pour les tubes sensibilisés d'une part, et les tubes témoins d'autre part. On trouve en effet les chiffres suivants :

- 323,9 pour les tubes sensibilisés
- 175,9 pour les tubes témoins.

Les remarques que l'on peut en tirer semblent assez évidentes :

- Tout d'abord, le chiffre obtenu pour les tubes témoins est en soi beaucoup trop élevé, puisque divisé par 30 on obtient un chiffre moyen de 5,8 rosettes 0/00.
- Ensuite, rapporté au chiffre obtenu pour les tubes sensibilisés, on constate que celui-ci est supérieur à la moitié de celui-là, ce qui fait que selon les critères que nous avons pris pour déclarer positif un résultat, le résultat "global" est négatif.

II - Etude de quelques cas particuliers.

1/ Cas n° 5 et 6.

Mme REC..., allergie à la pénicilline cliniquement très nette, et confirmée par le TTL positif.

Les deux tests ont été faits à quelques semaines d'intervalle, selon les mêmes modalités

techniques, et cette différence de temps ne peut pas être vraisemblablement mise en cause - dans cette allergie déjà assez ancienne - pour expliquer la discordance obtenue entre les deux résultats. Rappelons en effet que le premier essai donne un résultat franchement négatif avec 17 0/00 dans le tube sensibilisé contre 20,5 0/00 dans le tube témoin, tandis que l'on obtient un résultat franchement positif lors du deuxième essai, avec 7,2 0/00 dans le tube sensibilisé contre 1,6 0/00 dans le tube témoin.

2/ Cas n° 8 et 22.

Ces deux cas d'allergie, l'un à la pénicilline, l'autre à l'aspirine, sont tous deux "idéalement positifs" dans le fait qu'on ne trouve aucune rosette dans les tubes témoins. Mais si on considère ces deux cas par rapport au cas n° 27 d'allergie au pollen de graminées, où on ne trouve aucune rosette tant dans le tube sensibilisé que dans le tube témoin, alors que d'une part l'allergie est certaine, et que d'autre part le cas n° 29 d'allergie au pollen de graminées également, où l'on trouve 32,1 rosettes 0/00 dans le tube sensibilisé et 19 rosettes 0/00 dans le tube témoin, empêche d'invoquer un mécanisme d'inhibition de la formation des rosettes qui serait dû précisément à cet allergène, nous sommes forcés de constater que la valeur significative de ces deux témoins à 0/1.000 se trouve considérablement diminuée, et probablement réduite à l'intervention du hasard, tout au plus dirigé par d'imperceptibles modifications d'un certain nombre de paramètres des milieux au cours de l'expérimentation.

3/ Cas n° 9

Il s'agit d'un cas particulier et unique, où nous avons pratiqué, par défaut d'un autre

malade ce jour-là, un test "des rosettes" chez un consultant qui ne présentait qu'une simple suspicion clinique d'allergie à la pénicilline parmi d'autres antigènes possibles, et avant que ne soit pratiqué le TTL. Or, il se trouve que le TTL s'est montré par la suite absolument négatif pour la pénicilline, tandis que pour notre part nous avons trouvé un résultat quasi-positif, avec presque deux fois plus de rosettes dans le tube sensibilisé que dans le tube témoin, ce qui nous fait donc considérer ce résultat comme non significatif.

4/ Au total

L'ensemble des éléments incertains que nous venons de passer en revue nous oblige à conclure à la non fiabilité de ce test "des rosettes" appliqué au diagnostic de l'allergie médicamenteuse, et de l'allergie à la pénicilline et aux protéines en particulier. Rappelons pourtant que c'est précisément dans ce domaine que ses qualités théoriques, nous l'avons dit au début, l'imposaient. Bien entendu, cette conclusion négative s'adresse exclusivement à l'emploi du test "des rosettes" au diagnostic des formes d'allergie telles que nous les avons pratiquées, sans qu'il soit question de le condamner sur un plan théorique. Les résultats favorables enregistrés par ses promoteurs pourraient laisser penser que nos résultats négatifs étaient dus à une technique défectueuse. Mais si le lecteur veut bien se reporter au chapitre IV, il verra quelles difficultés nous avons rencontrées pour obtenir une mise au point apparemment satisfaisante de notre technique, avant de commencer l'étude des trente cas dont nous avons rapporté ici les résultats. Si donc nous concluons à une erreur technique de notre part, nous sommes forcés de constater

que ce test doit être alors extrêmement délicat à mettre en oeuvre, ce qui lui enlève de toutes façons deux des qualités théoriques que nous exposions au début : la simplicité de réalisation, et par suite la rapidité d'exécution. Toutefois, avant de condamner définitivement ce test, il y a lieu de considérer que notre expérience est basée sur un nombre restreint de cas étudiés ; mais n'est-il pas compréhensible que les résultats particulièrement défavorables obtenus pour ces trente premiers cas nous aient justement incités à arrêter là notre expérimentation ?

Nous voulons espérer que d'aucuns trouveront cependant que ce travail n'aura pas été inutile ; désireux de procéder à la réalisation de ce test, ils trouveront dans les fastidieuses mais précieuses données techniques que nous nous sommes efforcés d'exposer en détail dans les chapitres III et IV, des éléments propres à leur faciliter le travail, et aussi à leur éviter de travailler dans des voies dont nous avons montré la faillite.

Ainsi donc, si nous n'osons condamner par prudence que notre technique, sans oser condamner par une extrapolation peut-être abusive "le" test "des rosettes" en général, il nous faut néanmoins reconnaître que nous ne voyons pas où peut bien se situer la faute ayant pu entraîner la faillite de cette expérimentation. Nous ne pouvons, par conséquent, qu'exprimer les plus grandes réserves sur la valeur et l'avenir de ce test, appliqué tout au moins au diagnostic de l'allergie médicamenteuse.

CONCLUSIONS

1°/ Nous avons cherché à appliquer le phénomène d'immuno-cyto-adhérence, encore appelé "test des rosettes", au diagnostic étiologique des allergies cliniques à des médicaments divers, à la pénicilline, et à des protéines animales ou végétales.

2°/ L'épreuve consiste à incuber les lymphocytes circulants de l'individu atteint d'allergie, avec des hématies hétérologues sur lesquelles l'allergène a été fixé. Chaque épreuve comporte à côté d'un tube contenant des hématies marquées par l'antigène, un tube témoin où les hématies n'ont pas été sensibilisées. On établit le pourcentage des cellules qui ont fixé les hématies sensibilisées par l'antigène, par comparaison avec le tube témoin.

3°/ Sur trente malades étudiés, un tiers seulement (11/30) ont eu une réaction significativement positive.

4°/ La répartition des résultats positifs selon la nature des médicaments est variable.

5°/ Le fait que des résultats négatifs ont été enregistrés dans des cas d'allergie éprou-

vée : allergie aux pollens et à la pénicilline, laisse planer un doute sur la signification des résultats positifs, bien souvent en désaccord avec le test de transformation lymphoblastique.

6°/ L'ensemble des éléments rapportés et discutés plus haut oblige à conclure à la non-fiabilité du test des "rosettes", tout au moins dans les conditions techniques que nous avons adoptées.

-:-

Vu :
Le Président :
Signé : P. MILLIEZ

Vu :
Le Doyen :
Signé : G. BROUET

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :
Signé : Jean ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - HALPERN B.N.
Substances libératrices et processus de libération de l'histamine endogène.
Actualités pharmacologiques, 1960, 13, 109.
- 2 - HALPERN G.M.
A propos de l'activité histamino-libératrice de la colistine.
Revue française d'allergie, 1965, 5, 233.
- 3 - REDMOND A. et LEVINE B.
Relayed hypersensitivity in man.
Journal of allergy, 1966, 37, 98.
- 4 - LEVINE B. et ZIOLOV D.
Further studies on the prediction of penicillin allergy by immunological tests.
American academy of allergy, 3 fév. 68 - Boston - Massachusetts.
- 5 - KNUDSON E., ROBINSEN D. et CROYDEN E.
Cutaneous sensitivity to purified penicillin.
The lancet, 1967, 1, 1184.

- 6 - GERVAIS P., GARELLY E., MARAULT S. et REINBERG A.
Le test de la fenêtre dermique en allergologie.
Revue française d'allergie, 4 juin 67.
- 7 - SEINFELD B. et COMBS R.
Skin window test : an aid in diagnosis of drug allergy.
Journal of allergy, 1951, 191, 1056.
- 8 - WEISS A.
Skin window technic, a new diagnosis in humoral allergy.
Symposium allergologicum in Prague, 1967.
- 9 - FELLNER M., BALL E., BUSTOR A. et BAER R.
Delayed skin-test reactions to penicillin.
American academy of allergy, 3-2-68,
Boston, Massachusetts.
- 10 - ARBESMAN C.
In vitro methods of demonstrating antibodies of atopic individual.
5ème congrès d'allergie, Madrid, 1964,
143.
- 11 - RADERMECKER M. et SALMON J.
Etude de la séroagglutination d'hématies pénicillinées chez l'homme allergique et non allergique à la pénicilline.
Acta allergologica, 1966, 21, 283.
- 12 - LAUGIER J., MIKOL C., PAUPE J., BRUNET D. et VIALATTE J.
Application d'une technique d'hémagglutination à l'étude de l'allergie à la pénicilline.
Revue française d'allergie, 1-2-67.

- 13 - THIEL J., MITCHELL S. et PARKER C.
The specificity of hemagglutination reactions in human and experimental penicillin hypersensitivity.
Journal of allergy, 1964, 35, 399.
- 14 - DE WECK A.
Penicillin allergy : its detection by improved hemagglutination technic.
Nature, 1964, 202, 975.
- 15 - LEY A., HARRIS J. et BRINKLEY J.
Circulating antibody directed against penicillin.
Science, 1958, 127, 1118.
- 16 - HARRIS J. et VAUGHAN J.
Immunologic reactions to penicillin.
Journal of allergy, 1961, 32, 119.
- 17 - HEGGIE A.
Incidence of circulating antibody to penicillin, in penicillin hypersensitivity.
New England journal of medecine, 1960, 262, 1160.
- 18 - RUDZKY E., LUKASIAK B. et LESZCZYNSKI W.
Penicillin hypersensitivity and hemagglutinating antibodies in workers at a penicillin factory.
Acta allergologica, 1965, 20, 206.
- 19 - SCHWARTZ R. et VAUGHAN J.
Immunologic responsiveness of man to penicillin.
J.A.M.A., 1963, 185, 584.

- 20 - VAN ARSDEL P., TOBE A. et PASNICK L.
Association of hemagglutinating antibodies
in penicillin hypersensitivity.
Journal of allergy, 1964, 35, 399.
- 21 - WATSON K. et JOUBERT S.
The occurrence of hemagglutinating anti-
body to penicillin.
Immunology, 1960, 3, 1.
- 22 - CRIEP L. et FRIEMAN H.
Allergy to phenethicillin.
New England journal of medecine, 1960,
203, 891.
- 23 - APP M.
Serological procedures to the detection
of antibodies to penicillin.
Science, 1959, 130, 1472.
- 24 - HURIEZ C., JACOB M., MARTIN P., BAELDEN J.
et FOSSATI R.
Etude de l'hémagglutination et des tests
cutanés dans 29 cas d'intolérance péni-
cillinée à manifestations cutanées.
Bulletin de la société française de derma-
to-syphiligraphie, 1963, 70, 173.
- 25 - HALPERN B., JACOB M., BINAGHI R. et
PARLEBAS M.
Mise en évidence et dosage des anticorps
allergiques par l'hémagglutination in
vitro.
Revue française d'allergie, 1961, 1, 201.
- 26 - BOWZYC J.
Sur la valeur diagnostique des différents
tests sérologiques et du test de Shelley
en particulier.
Annales de dermato-syphiligraphie, 1966,
93, 271.

- 27 - CHARPIN J., VITRY G. et OHRESSER P.
Allergie médicamenteuse et test de
Shelley.
Médecine et hygiène, 1965, 23, 677.
- 28 - SHELLEY W.
Indirect basophil degranulation test for
allergy to penicillin or other drugs.
J.A.M.A., 1963, 184, 171.
- 29 - VAUTRIN D.
Le basophile dans la séquence des réac-
tions allergiques.
Thèse, Nancy, 1967.
- 30 - VAUTRIN D. et GRILLAT J.
Signification et valeur diagnostique du
test de Shelley.
Symposium allergologicum in Prague, 1967,
221.
- 31 - MAXIMOW A.
Development of the granular leucocytes in
vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1927, 24, 570.
- 32 - NOWELL P.
Phytohemagglutinin : initiator of mitosis
in culture of normal human leucocytes.
Cancer research, 1960, 20, 462.
- 33 - PEARMAIN G., LYCETTE R. et FITZGERALD P.
Tuberculin induced mitosis in peripheral
blood leucocytes.
The lancet, 1966, 2, 803.
- 34 - ELVES M., ROTH S. et ISRAEL M.
Response of lymphocyte to antigen challen-
ge in vitro.
The lancet, 1963, 1, 806.

- 35 - HIRSCHORN I., BACH F., KOLODNY R.,
FIRSCHEIN I. et HASHEM N.
Immune response and mitosis of human peri-
pheral blood lymphocytes in vitro.
Science, 1964, 142, 1368.
- 36 - HOLLAND P. et HAMER A.

Drug induced in vitro stimulation of peri-
pheral lymphocytes.
The lancet, 1964, 1, 1368.
- 37 - KY N., HALPERN B., LAGRUE G. et LANGLOIS C.
Transformation lymphoblastique in vitro
des lymphocytes sanguins appliquée à
l'étude de l'allergie microbienne.
Presse médicale, 1966, 1119.
- 38 - HALPERN B., KY N. et AMACHE N.
Diagnostic de l'allergie médicamenteuse
in vitro par utilisation du test de trans-
formation lymphoblastique.
Presse médicale, 1967, 461.
- 39 - PINON C.
L'allergie médicamenteuse et son diagnos-
tic par le TTL.
Thèse Paris, 1968.
- 40 - ZAALBERG O.
A simple method for detecting single
antibody-forming cells.
Nature, 1964, 202, 1231.
- 41 - OSIPOVA P. et KARASIK O.
Specificity of erythrocyte adhesion to
the lymph cell surface in vitro.
Bull. exp. biol. med., 1964, 58, 100.

- 42 - NOTA N., LIACOPOULOS-BRIOT M., STIFFEL C.
et BIOZZI G.
L'immuno-cyto-adhérence : une méthode
simple et quantitative pour l'étude in
vitro des cellules productrices d'anti-
corps.
C.R. de l'Académie des Sciences de Paris,
1964, 259, 1277.
- 43 - BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D.,
LIACOPOULOS-BRIOT M. et col.
Etude du phénomène de l'immuno-cyto-
adhérence au cours de l'immunisation.
Annales de l'Institut Pasteur, 1966, 110,
7.
- 44 - BIOZZI G., STIFFEL C. et MOUTON D.
International symposium on immunity,
cancer and chemotherapy. A study of anti-
body containing cells in the course of
immunization.
Buffalo Academic press, 1966, New-York.
- 45 - BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D.,
DECREUSEFON C. et BOUTHILLIER Y.
A kinetic study of antibody producing
cells in the spleen of a mice immunized
intraveinously with sheep red cells.
Immunology, 1968, 14, 7.
- 46 - HULLIGER L. et SORKIN E.
Synthesis of antibodies by blood leucocy-
tes of the rabbit.
Nature, 1963, 198, 299.
- 47 - LANDY M., SANDERSON R., BERNSTEIN M. et
JACKSON A.
Antibody production by leucocytes in peri-
pheral blood.
Nature, 1964, 204, 1320.

- 48 - COHN M., HARIBATA K. et LENNOX E.
Antibody formation by lymph node cells.
Journal of immunology, 1964, 92, 335.
- 49 - BACH F. et HIRSCHORN K.
Gammaglobulin production by human lymphocytes in vitro.
Exp. cell. research, 1963, 32, 592.
- 50 - MELLORS R. et KORNGOLD
The cellular origin of human immunoglobulin.
Journal of experimental medecine, 1964, 118, 387.
- 51 - CRUCHAUD S. et FREI P.
Demonstration of specific antibodies on human circulating lymphocytes by a new technic.
Internat. Arch. Allergy, 1967, 31, 455.
- 52 - STAVITSKY A.
Micromethods for the study of proteins and antibodies.
Journal of immunology, 1954, 72, 360.
- 53 - PARKER C.
Immunochemical mechanism in penicillin allergy.
Federation proceeding, 1965, 24, 51.
- 54 - PARKER C.
The biochemical basis of an allergy drug response.
Annales new-yorkaises de l'Académie scientifique, 1965, 123, 55.

- 55 - SCHNEIDER C. et DE WECK
A new chemical aspect of penicillin
allergy.
Nature, 1965, 208, 57.
- 56 - BRANDT L., BORJESON J., NORDEN A. et
OLSSON I.
Separation of lymphocytes from peripheral
blood by means of a glass wool column.
Acta med. Scand., 1962, 172, 459.
- 57 - CZISMAS L.
Preparation of formalinized erythrocytes.
Proc. Soc. exp. biol., New-York, 1960,
103, 157.

SERMENT

--:--

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers Condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

--:--

